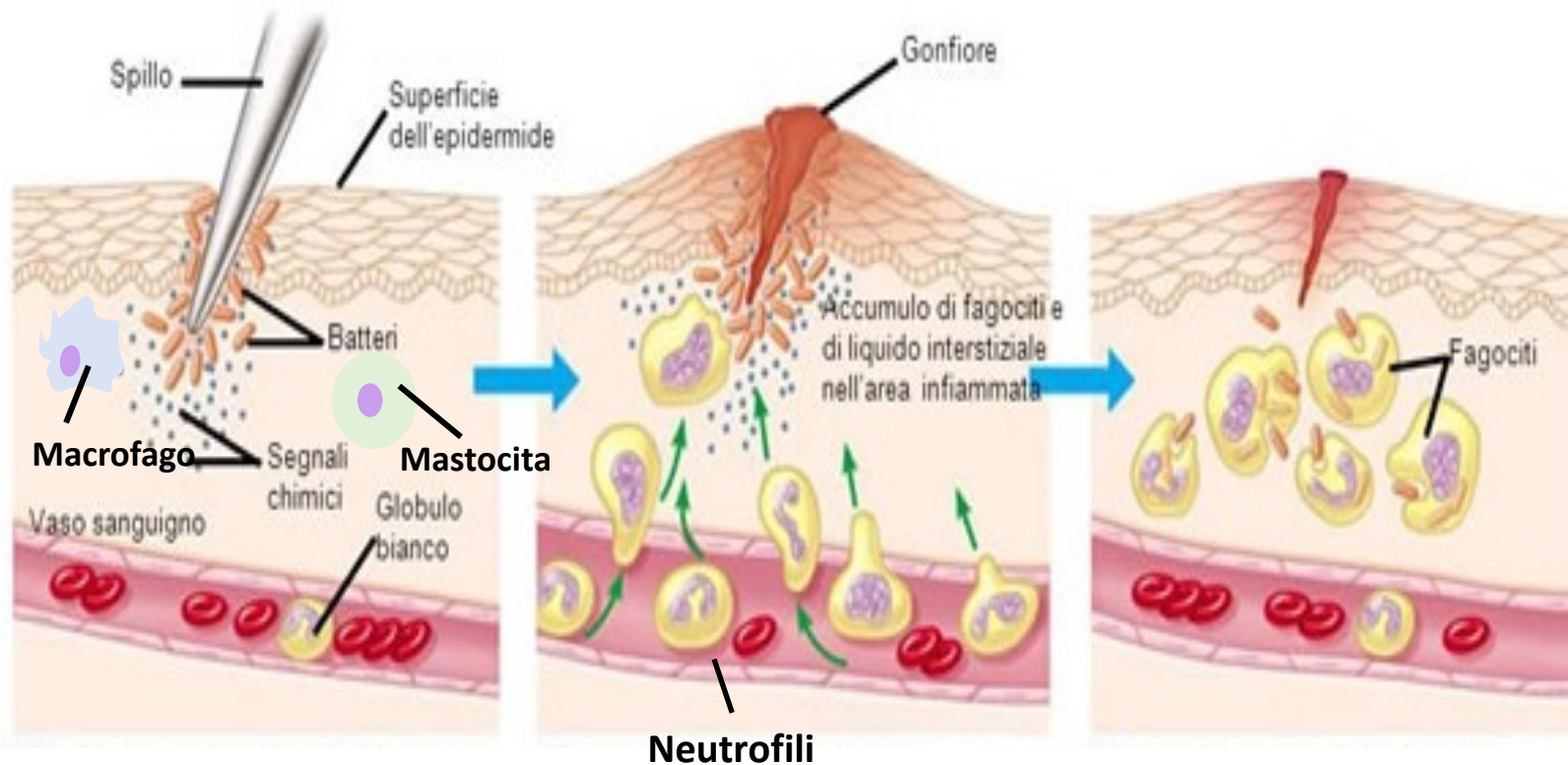
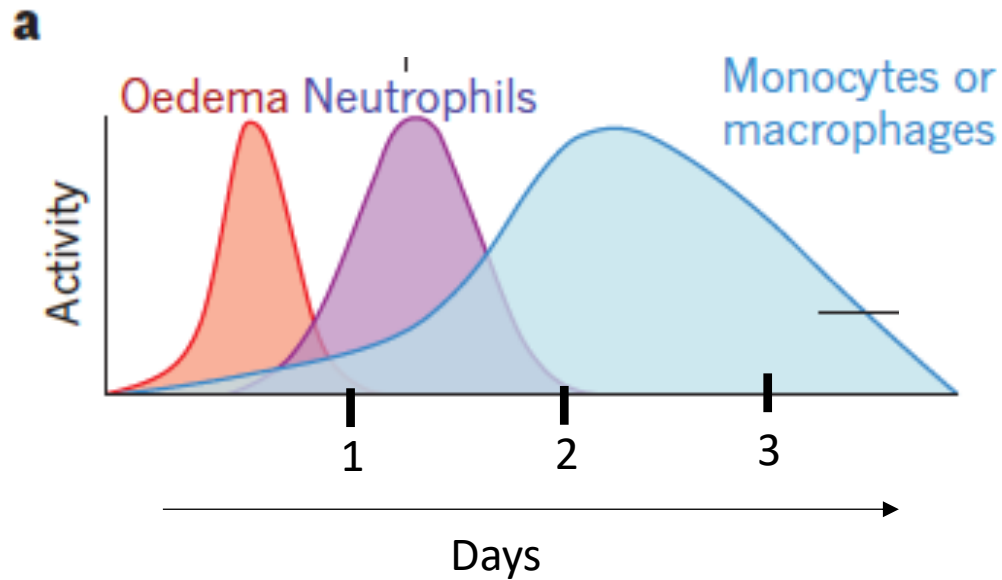


## La risoluzione dell'inflammatione



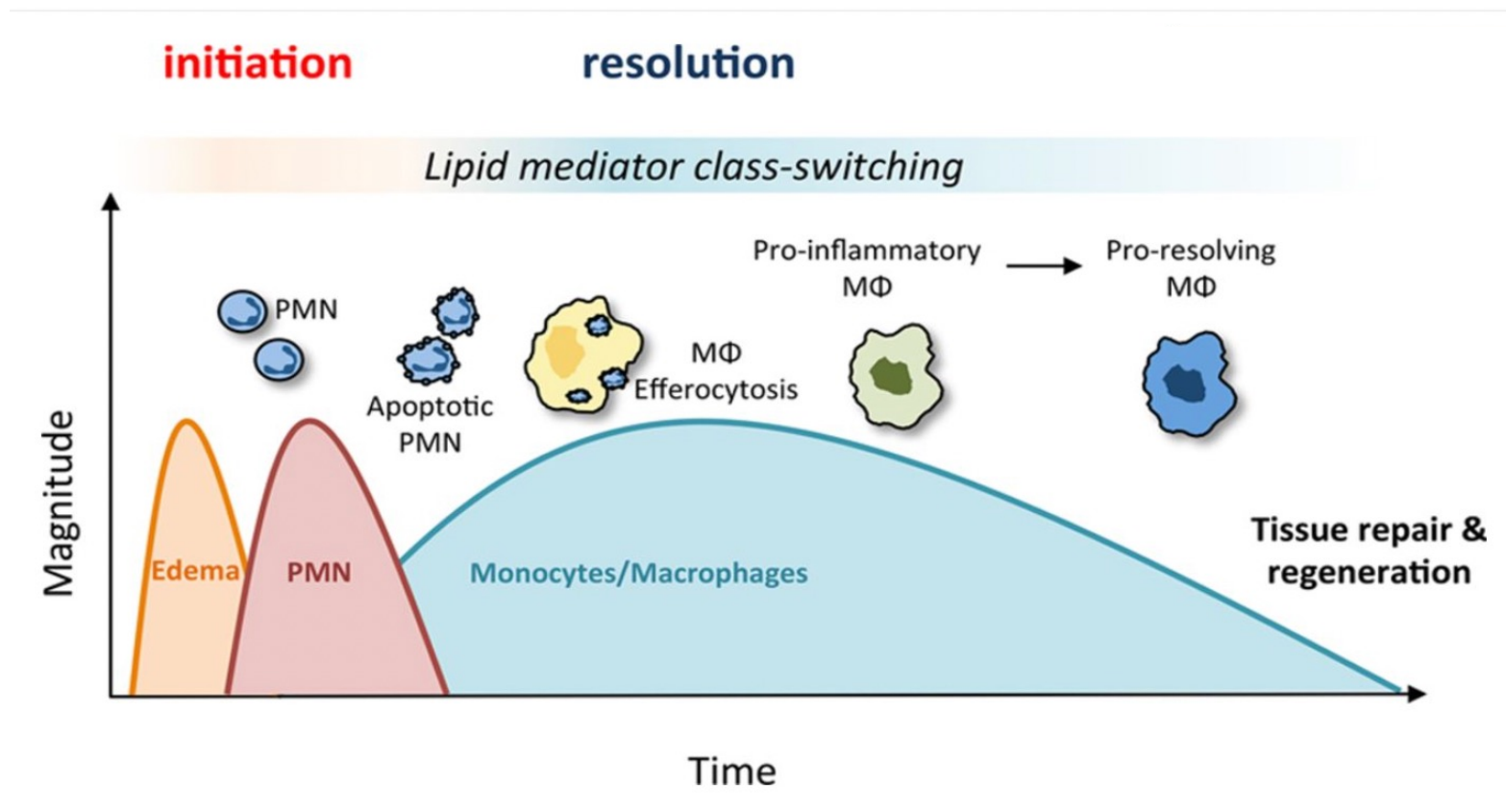
L'inflammatione è una risposta protettiva ad agenti lesivi che ha come obiettivo l'eliminazione della causa del danno cellulare. L'inflammatione coinvolge vasi sanguigni, cellule e mediatori dell'ospite. Oltre alla eliminazione della causa del danno e delle cellule danneggiate l'inflammatione inizia gli eventi che portano alla guarigione e alla riparazione dei siti danneggiati.

## Infiltrati leucocitari nell'inflammatione acuta



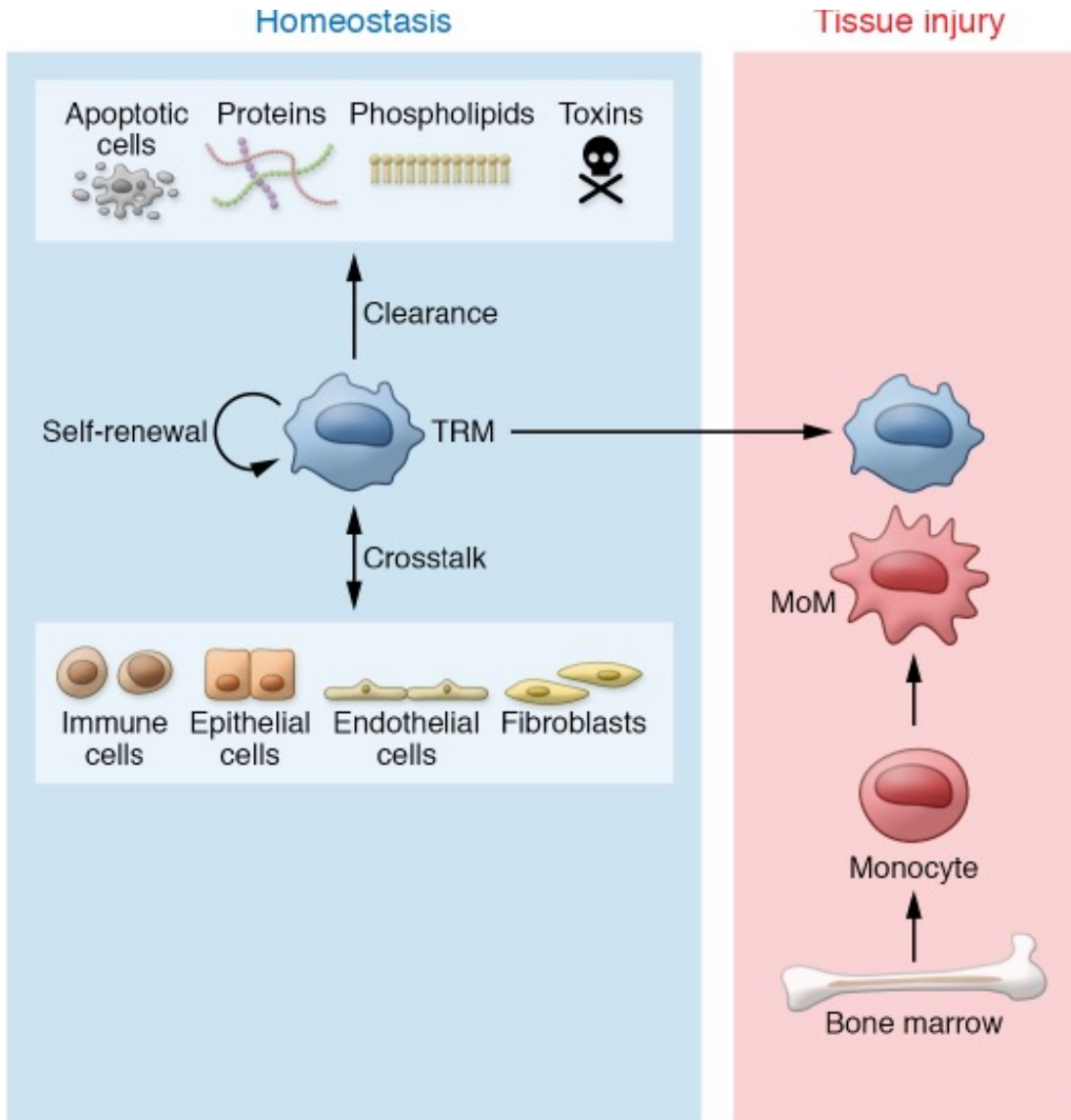
Nel processo infiammatorio acuto i neutrofili rappresentano la componente cellulare che per prima infila il tessuto (6-24 ore). Successivamente i neutrofili sono sostituiti dai monociti (24-48 ore).

## Risoluzione dell'inflammatione



La risposta infiammatoria acuta può essere divisa in due fasi: l'inizio e la risoluzione. La risoluzione dell'inflammatione ha inizio quando i neutrofili che sono stati richiamati nel tessuto dallo stimolo flogistico diventano apoptotici. I neutrofili apoptotici sono rimossi dai macrofagi che derivano dal differenziamento dei monociti richiamati dal circolo sanguigno nel tessuto.

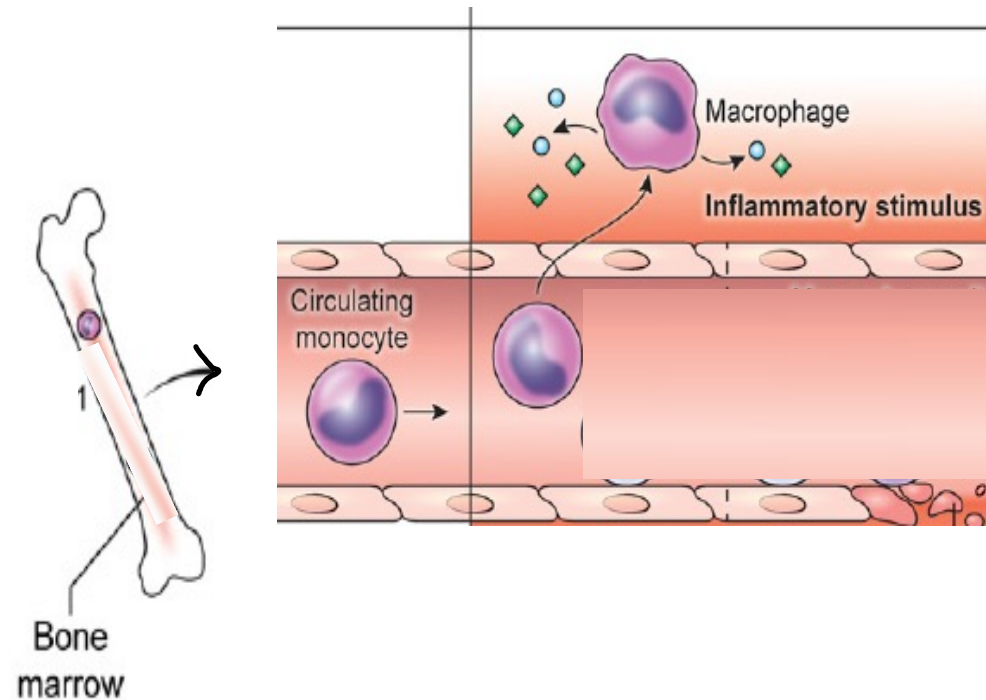
# I macrofagi residenti nei tessuti e derivati dai monociti



Durante il processo infiammatorio i macrofagi nel tessuto interessato derivano dal differenziamento dei monociti. Durante il processo infiammatorio si osserva un aumento sia dei macrofagi che risiedono nel tessuto o che derivano dai monociti.

TRM= tissue resident macrophages, MoM= monocyte derived macrophages

## Reclutamento dei monociti nel sito leso



Durante la risposta infiammatoria acuta i monociti vengono reclutati dal circolo sanguigno e raggiungono i siti di infiammazione richiamati dalla chemochina CCL2.

Tale chemochina è prodotta dai macrofagi, monociti, fibroblasti e cellule epiteliali.

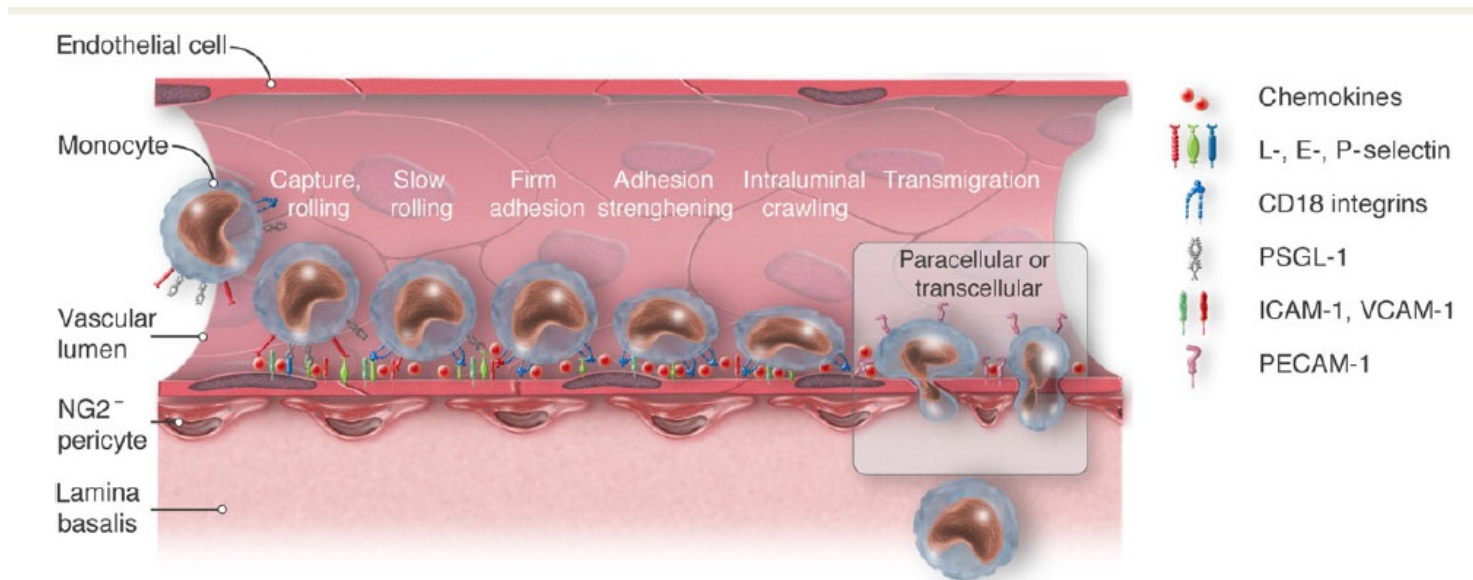
I monociti sono caratterizzati dalla capacità di fagocitare, produrre specie reattive dell'ossigeno e molecole pro-infiammatorie quali l'IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL2.

## Extravasazione dei monociti

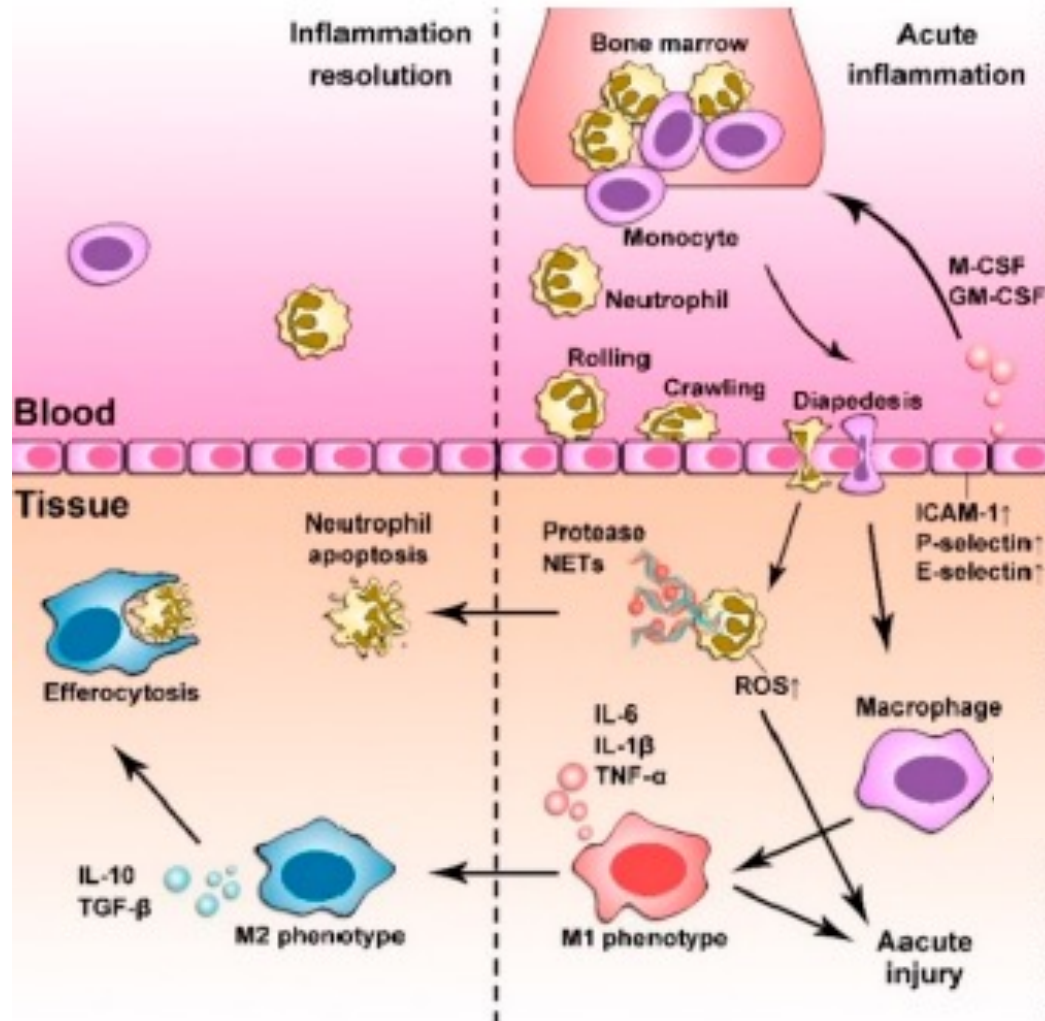
Nella extravasazione dei monociti l'interazione fra il PSGL-1 espresso dai monociti con le P- e E-selettine media l'adesione debole e il rolling.

L'adesione forte è mediata dall'interazione VLA-4 con VCAM1 e dalla chemochina CCL2 che lega il recettore CCR2.

Il crawling dipende da LFA1, Mac1 e ICAM-1 e ICAM-2.



# Plasticità dei macrofagi

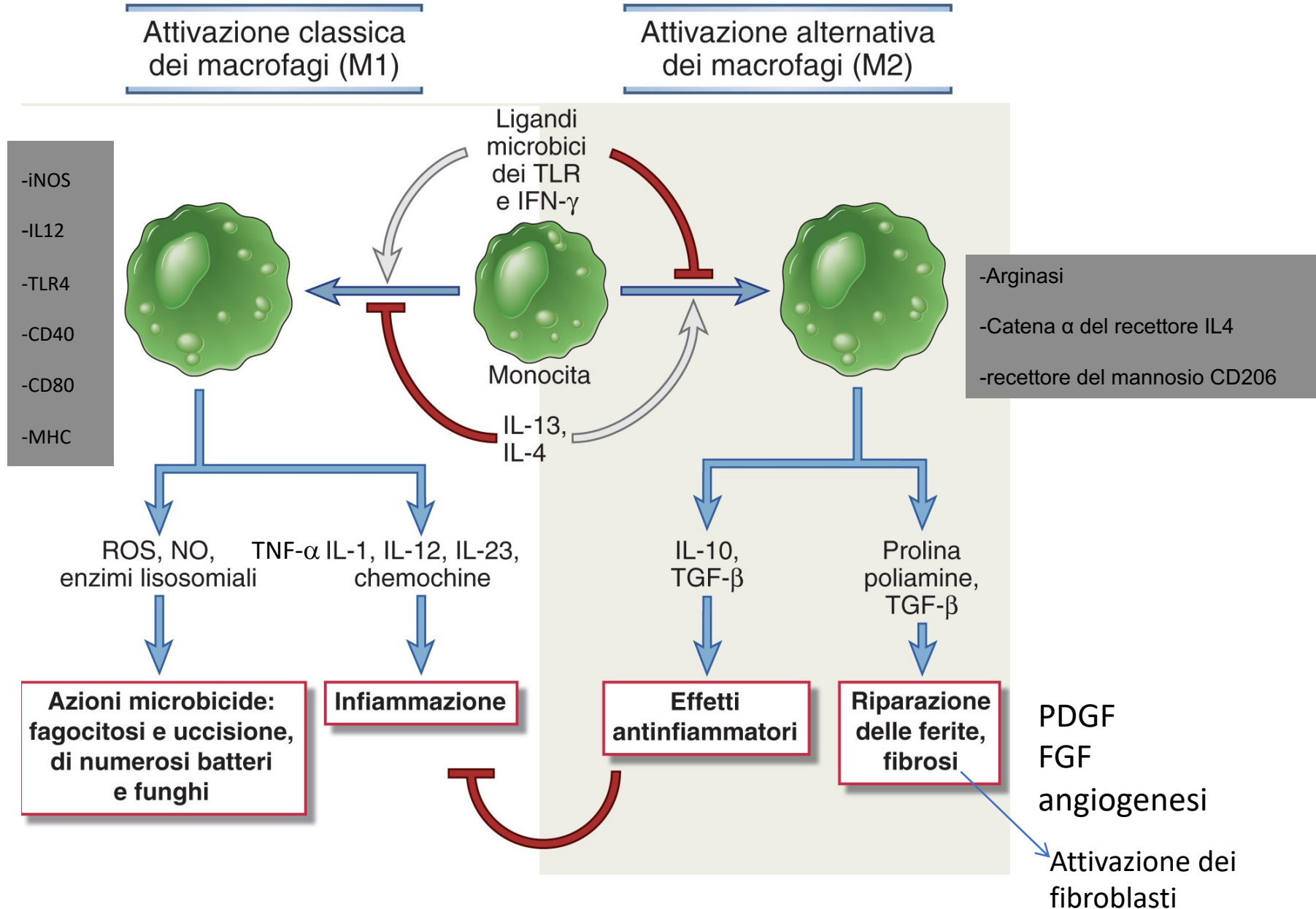


Nel tessuto infiammato i monociti reclutati danno origine ai macrofagi.

I macrofagi sono cellule plastiche e possono andare incontro a due diversi differenziamenti. I macrofagi polarizzati M1 producono citochine pro-infiammatorie e chemochine.

I macrofagi M1 nel corso dell'infiammazione sono sostituiti dai macrofagi che promuovono la guarigione delle ferite e definiti M2.

# Attivazione dei macrofagi: classica o alternativa



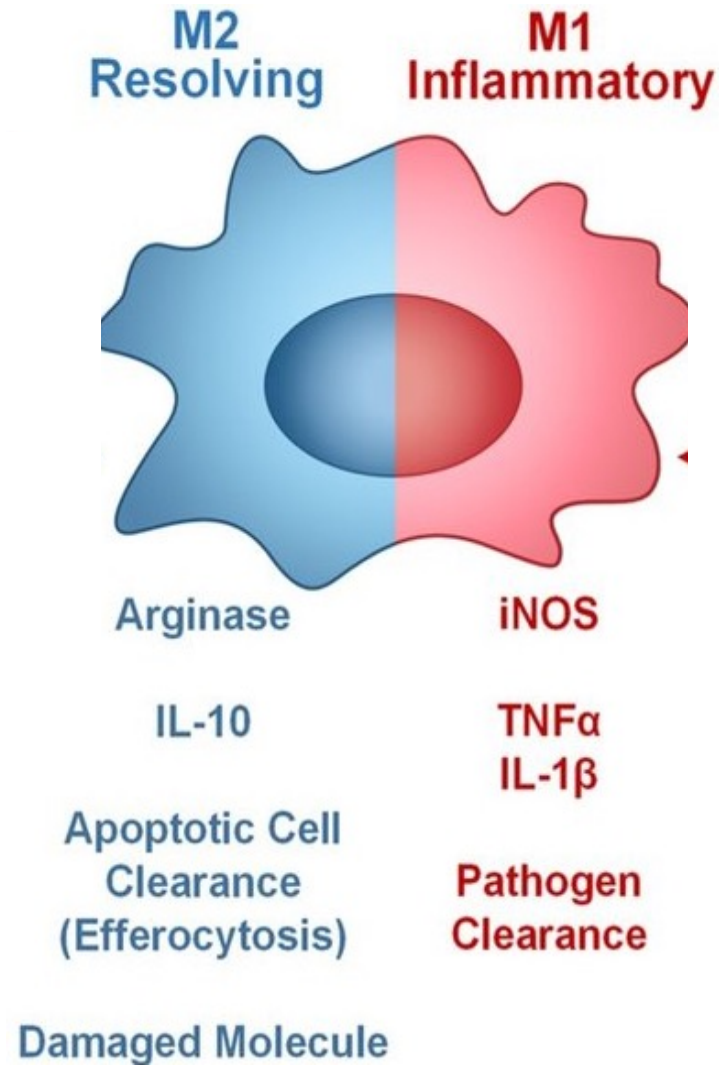
# Macrofagi M1 e M2

Le citochine come l'IL-4 e l'IL-13 inducono lo stato "alternativo" di attivazione dei macrofagi (AAM) che si associa al riparo del tessuto, e a funzioni immunoregolatorie.

Tali citochine attivano i macrofagi con funzioni pro-angiogeniche, pro-fibrotiche. Tali macrofagi producono il PDGF, il TGF- $\beta$ , VEGF e diverse metalloproteasi che regolano l'attivazione dei miofibroblasti e la deposizione di componenti della matrice extracellulare (collagene).

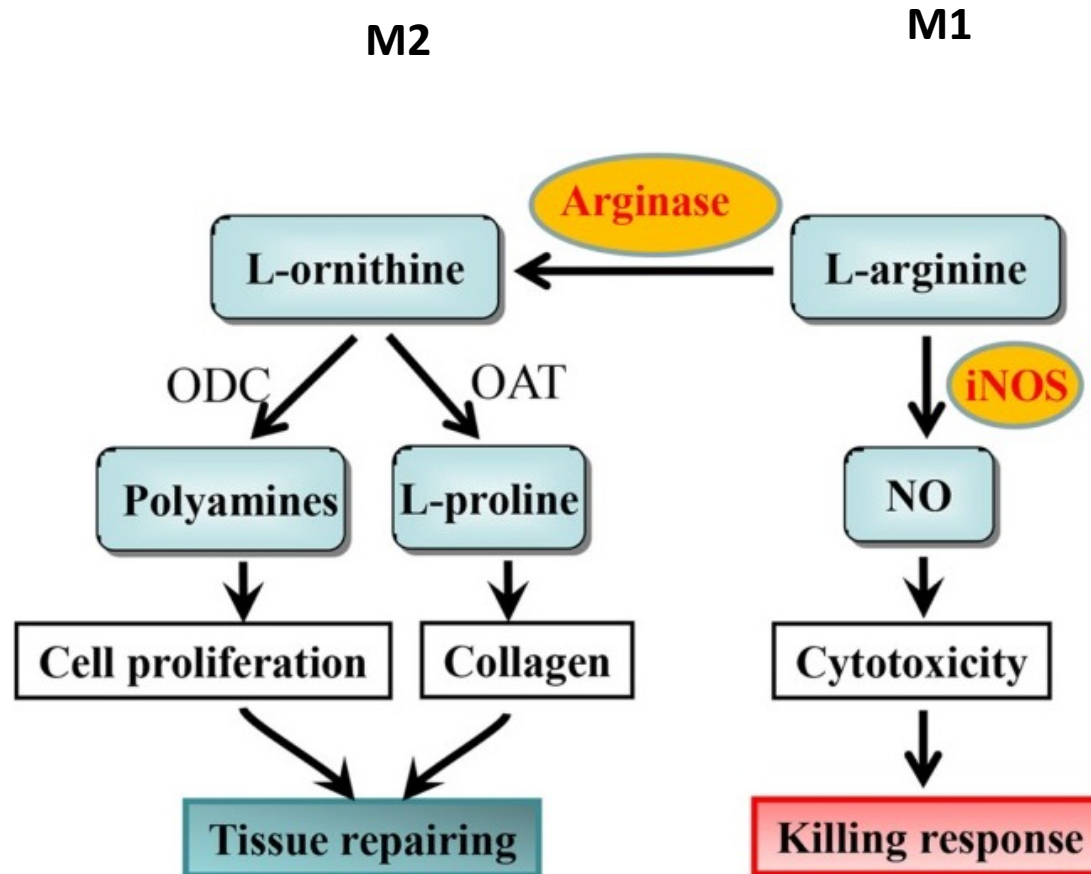
I macrofagi alternativamente attivati producono anche proteine ad attività immunoregolatoria quali: l'arginasi 1, l'IL-10. Per questo diversamente dai CAMs gli AAMs sono coinvolti nella soppressione della risposta immune e nella risoluzione della risposta infiammatoria.

L'attivazione dei macrofagi con attività immunoregolatoria è indotta anche da stimoli quali la fagocitosi di cellule apoptotiche, il microambiente tumorale.



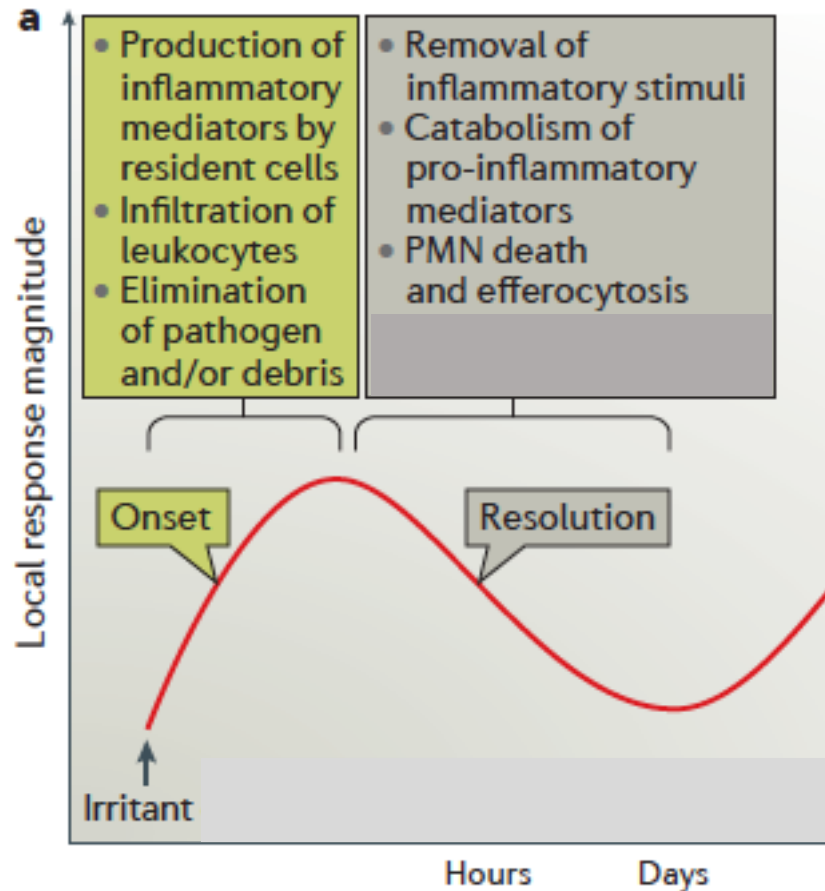
I macrofagi sono cellule plastiche che adottano diversi stati di attivazione a seconda dell'ambiente in cui si trovano. Durante l'invasione da parte di patogeni i macrofagi adottano un fenotipo "infiammatorio" o "attivato". Queste cellule sono comunemente definite classicamente attivate (CAMs). Questa attivazione è stata la prima ad essere descritta. I macrofagi possono essere attivati classicamente o dall'IFN- $\gamma$  o dalla stimolazione dei Toll like receptor. Tali stimoli determinano la secrezione di citochine pro-infiammatorie quali l'IL-1, il TNF-a, l'IL-6.

# Metabolismo dell'arginina nei macrofagi M1 e M2



L'arginasi idrolizza l'arginina in ornitina e urea. L'ornitina viene utilizzata per la sintesi di prolina e poliamine necessarie per la sintesi di collagene e per la proliferazione cellulare.

# Risoluzione dell'inflammatione



Il periodo fra il picco dell'influsso delle cellule infiammatorie nel sito lesivo e l'eliminazione di tali cellule fino al ripristino dell'equilibrio funzionale viene definito risoluzione.

La risoluzione avviene attraverso una serie di processi che includono:

- L'eliminazione dell'agente lesivo che ha causato l'inflammatione.
- L'arresto della produzione dei mediatori pro-infiammatori e la degradazione dei pre-esistenti
- L'eliminazione dei leucociti reclutati mediata dai macrofagi (efferocitosi)
- L'eliminazione dei macrofagi derivati dai monociti dal tessuto

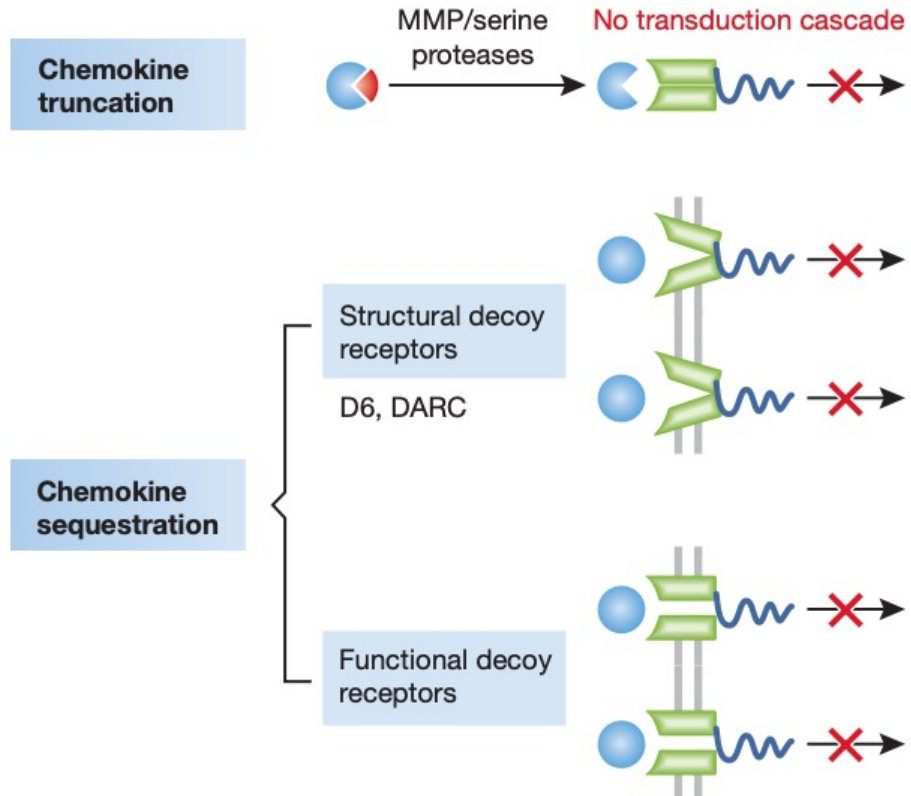
# Deplezione dei mediatori pro-infiammatori

Dopo l'eliminazione dello stimolo infiammatorio (agente lesivo), i livelli di mediatori pro-infiammatori (citochine, chemochine, eicosanoidi) devono tornare ai valori pre-infiammatori.

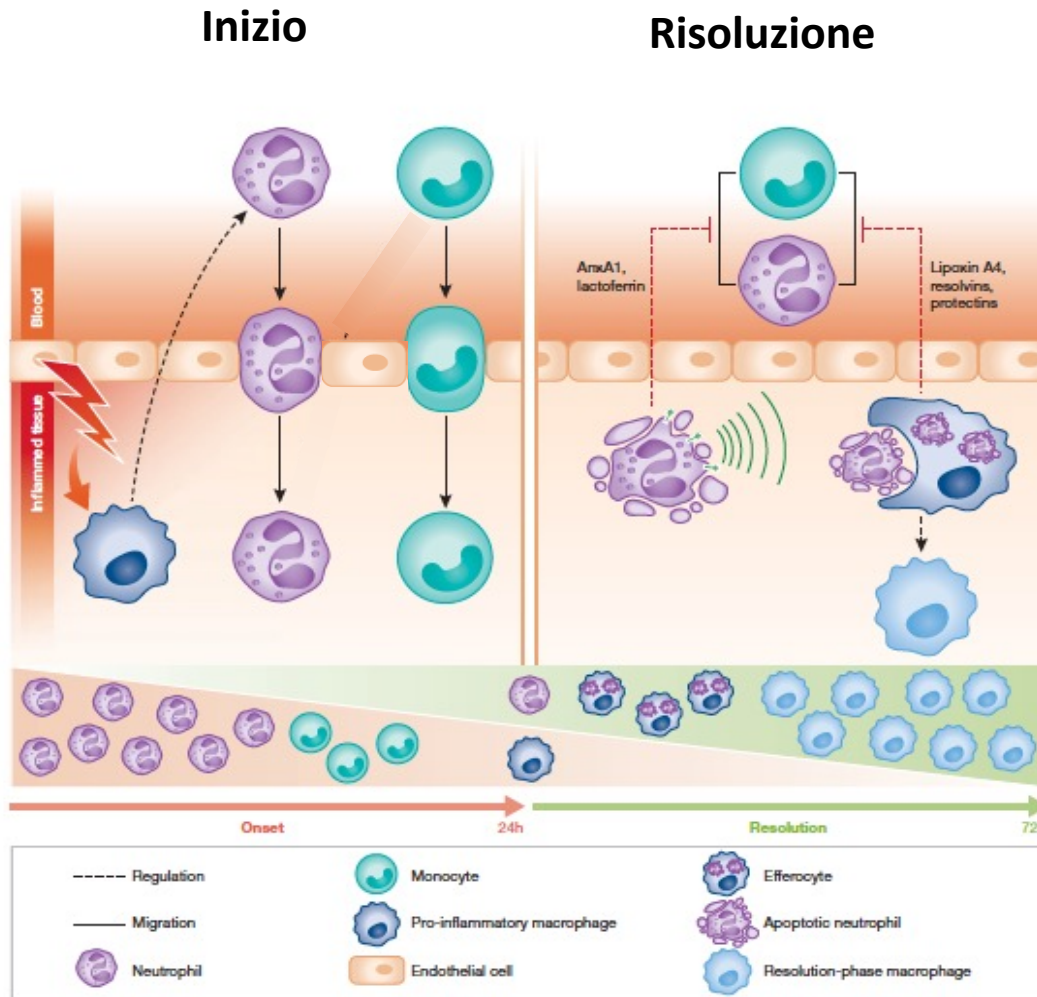
La deplezione delle chemochine può avvenire attraverso:

- la degradazione da parte delle metalloproteasi prodotte dai macrofagi.
- Il sequestro delle chemochine da parte di recettori non funzionali. Es: D6 che lega le CC chemochine ed è espresso sulle cellule endoteliali dei vasi linfatici, ma non è in grado di inviare una segnalazione intracellulare.

Le prostaglandine e i leucotrieni sono degradati



# L'apoptosi dei neutrofili è centrale nella risoluzione dell'inflammazione



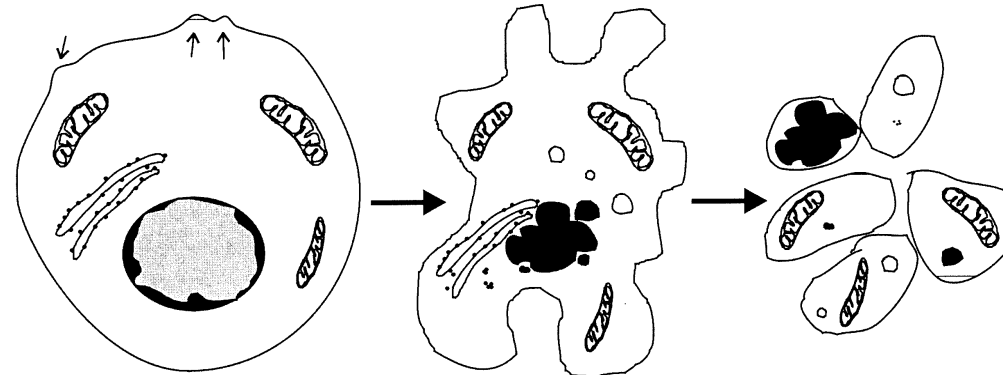
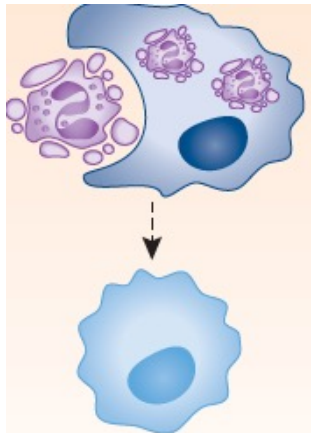
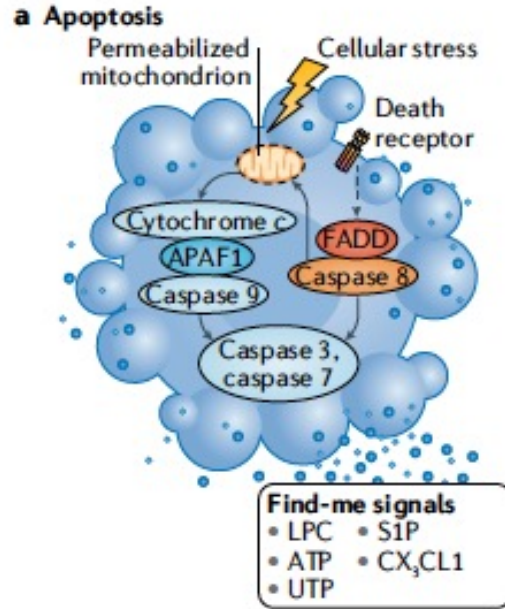
**Figure 1. Cellular interplay during resolution of inflammation.** Overview of cellular processes during onset (left) and resolution (right) of inflammation. During early phases of inflammation tissue-resident cells sense damage and launch the release of signals that induce rapid neutrophil and delayed monocyte emigration. Resolution is initiated when neutrophils become apoptotic thus secreting mediators that inhibit continued neutrophil infiltration. Ingestion of apoptotic neutrophils changes the macrophage phenotype towards a resolution-phase macrophage, which promotes return to tissue homeostasis. A switch in tissue (stromal) cells can also contribute to generate the initial signals for resolution to start.

La risoluzione dell'inflammazione ha inizio quando i neutrofili diventano apoptotici. La captazione dei neutrofili apoptotici da parte dei macrofagi, (efferocitosi; engulfment and clearance of dead and dying cells) è un processo anti-inflammatorio che si associa ad una ridotta produzione di citochine pro-inflammatorie e dei mediatori lipidici e all'attivazione di un programma trascrizionale anti-inflammatorio caratterizzato dal rilascio di IL-10 e TGF- $\beta$  da parte dei macrofagi. La rimozione tempestiva dei patogeni e dei corpi apoptotici è necessaria per evitare danni nei tessuti circostanti e per dare inizio al riparo del tessuto.

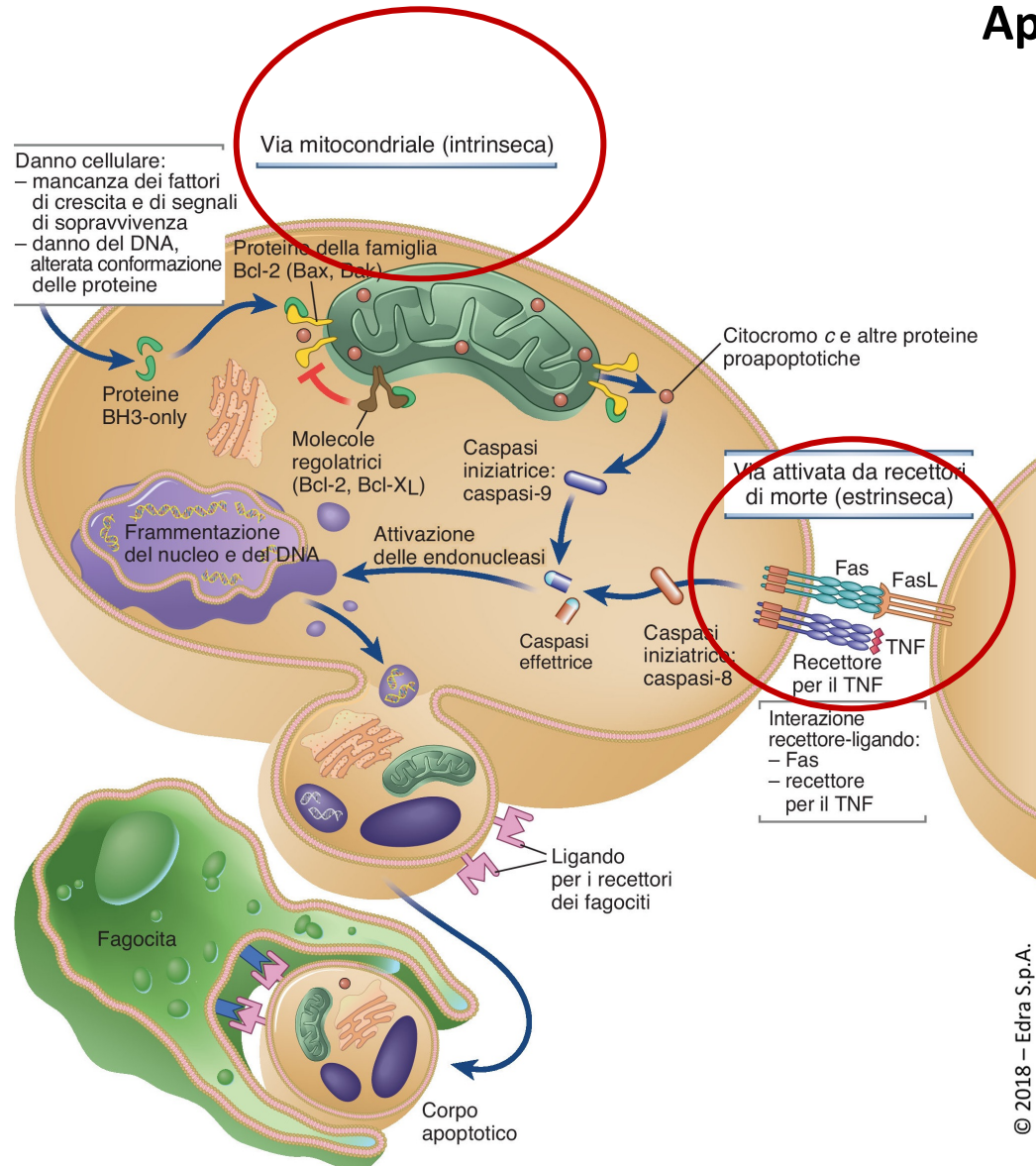
# L'apoptosi dei neutrofili

Durante l'apoptosi la cellula morente va incontro a:

- riduzione del volume cellulare; formazione di protuberanze della membrana plasmatica
- Compattamento della cromatina, frammentazione del DNA. Il nucleo può andare incontro a frammentazione all'interno della cellula.
- rottura della cellula in piccole vescicole chiuse chiamate corpi apoptotici composti da citoplasma e organelli con o senza frammenti nucleari. Durante l'intero processo, il contenuto cellulare non fuoriesce nell'ambiente extracellulare, in quanto si conserva l'integrità della membrana plasmatica.



# Apoptosi

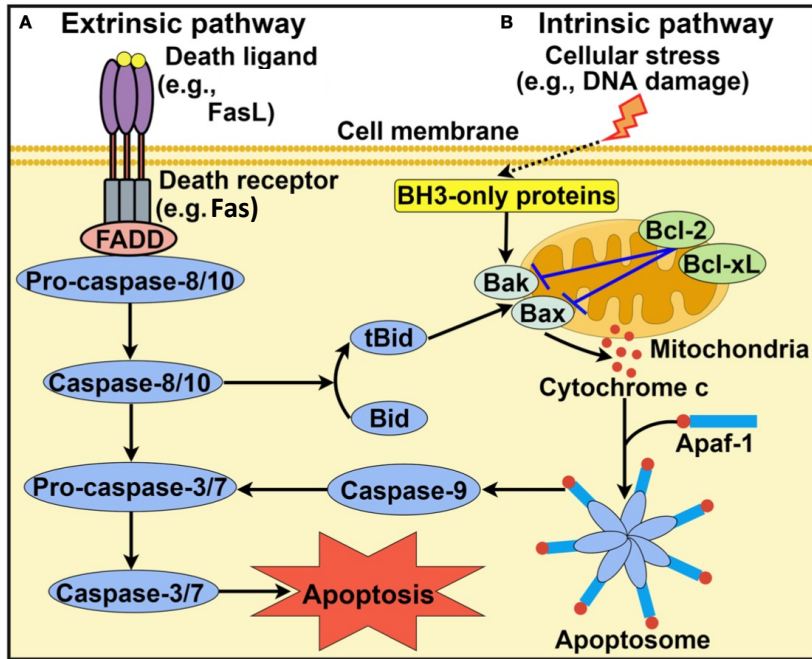


L'innesco dell'apoptosi può avvenire per **via estrinseca o intrinseca**.

**La via estrinseca** è innescata da recettori di morte espressi che attivano la caspasi 8 (cistein aspartato proteasi) scatenando una attivazione a cascata di altre caspasi. L'attivazione delle caspasi effettrici determina il taglio di diverse proteine cellulari fra cui quelle del citoscheletro o dell'inibitore della DNasi citoplasmatica con conseguente taglio internucleosomico del DNA.

**La via intrinseca** dipende dall'aumento della permeabilità mitocondriale e dal rilascio di molecole proapoptotiche nel citoplasma. La via intrinseca dell'apoptosi è regolata dalle proteine appartenenti alla famiglia BCL-2. Alcuni membri di questa famiglia sono pro-apoptotici e altri anti-apoptotici. Sotto stimoli apoptotici i membri proapoptotici della famiglia BCL-2 aumentano la permeabilità della membrana mitocondriale favorendo la fuoriuscita nel citoplasma del citocromo c. Il citocromo c lega APAF-1 che dopo polimerizzazione attiva la Caspasi 9 che a sua volta attiva le caspasi effettrici (caspasi -3,-6,-7).

# Apoptosi

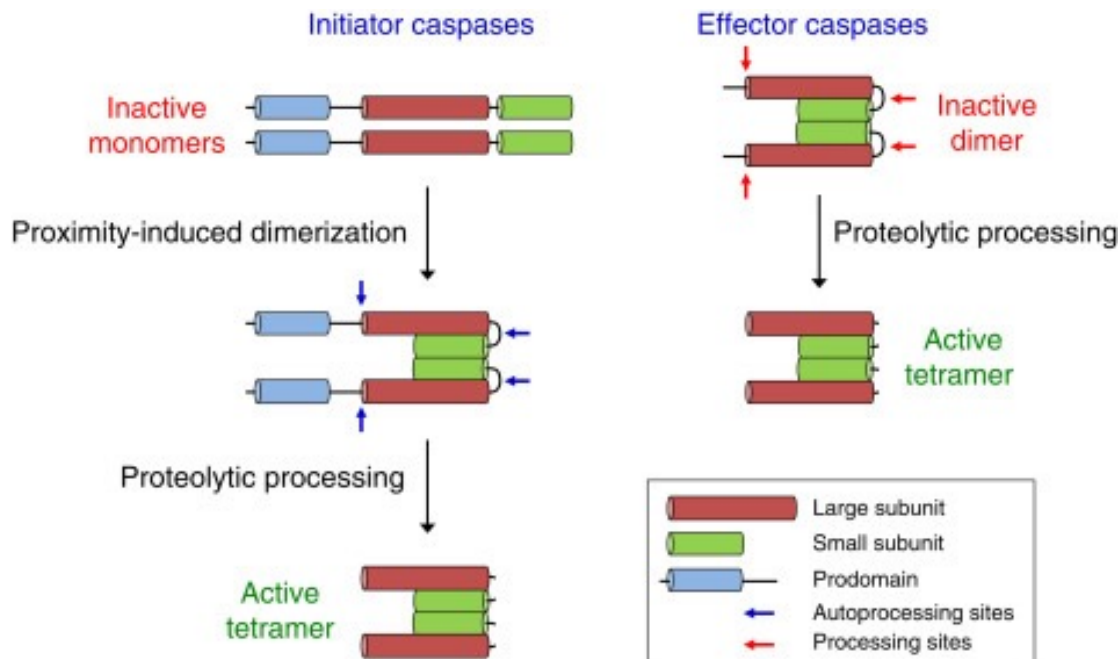


L'apoptosi è determinata dalla attivazione delle caspasi che sono proteasi contenenti cisteina nel loro sito attivo.

Le caspasi esistono come proenzimi inattivi che devono esse scissi per essere attivati.

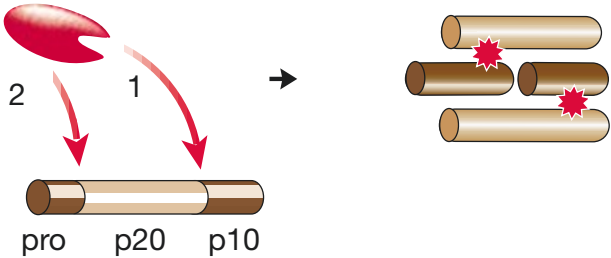
Il processo di apoptosi può essere distinto in una fase di inizio e una di esecuzione. Nella fase di inizio sono attivate le **caspasi iniziatrici** che agiscono sulle caspasi a valle. Nella fase di esecuzione sono attivate le **caspasi effettrici** che agiscono su proteine cellulari nucleari e citoplasmatiche responsabili della morte della cellula.

Le caspasi iniziatrici includono la caspasi 8 e la 9; le caspasi effettrici la 3, 6, 7.

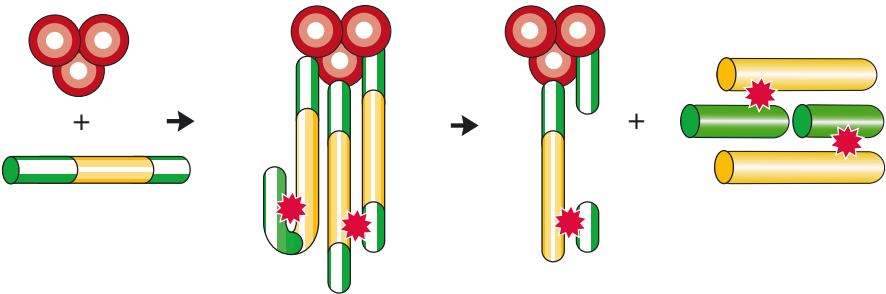


# Attivazione delle caspasi

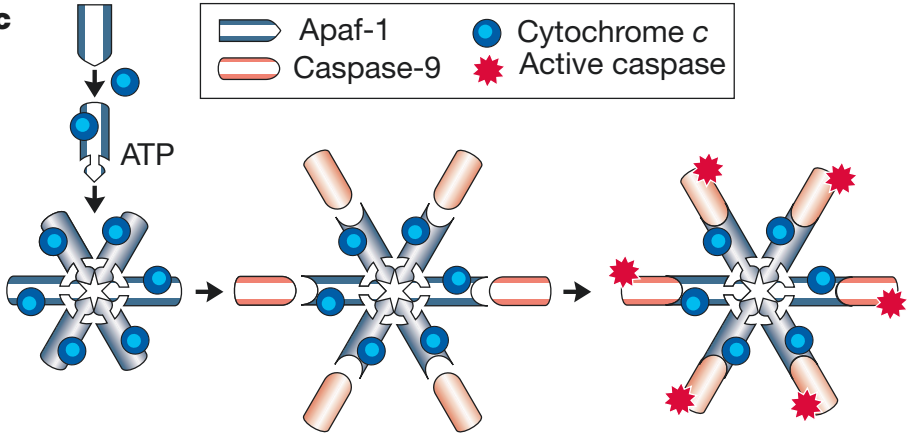
a



b

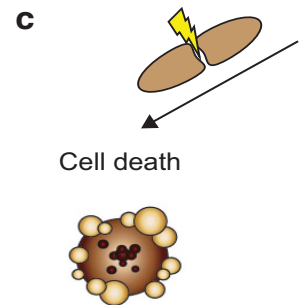
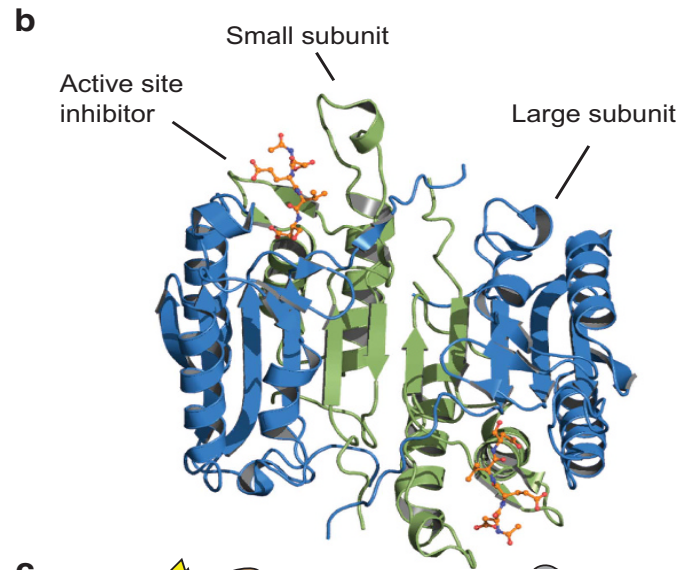
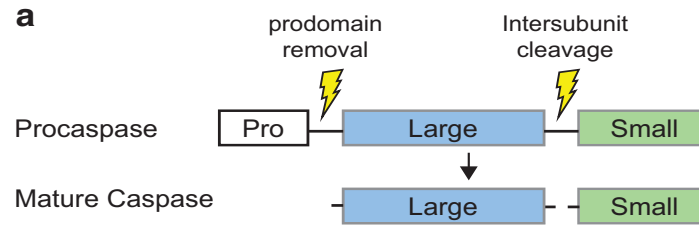


c



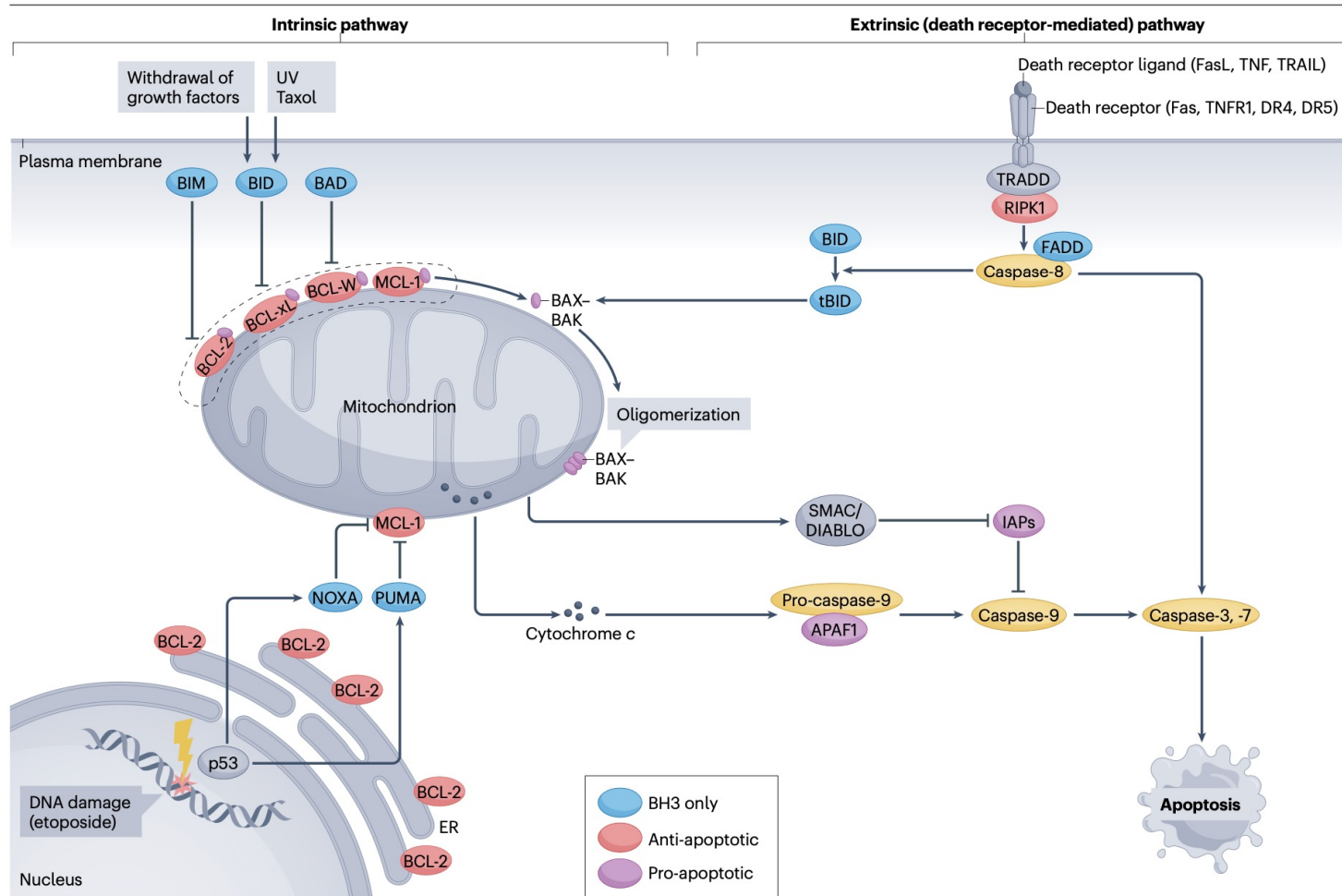
L'attivazione delle caspasi può avvenire attraverso la scissione proteolitica: i) da parte di una caspasi a monte; ii) per prossimità della caspasi (reclutamento e aggregazione della stessa pro-caspasi); iii) formazione di un olonucleo (formazione del complesso APAF-1 citocromo c caspasi-9).

# Struttura delle caspasi



Le caspasi effettrici mature sono formate da un dimero di due molecole orientate testa coda ciascuna costituita da una subunità large e una subunità small contenenti un sito attivo. Le pro-caspasi 8 e 9 sono dei monomeri e sono attivate in seguito a reclutamento su proteine adattatrici e/o taglio nella regione linker fra la subunità large e la subunità small. Le pro-caspasi effettrici (3, 6, 7) sono dimeri e sono attivate in seguito al taglio della regione linker fra la subunità large e small da parte delle caspasi iniziatrici.

# La via intrinseca dell'apoptosi è regolata dalle molecole appartenenti alla famiglia BCL-2



a

## Antiapoptotic BCL-2 proteins



BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, MCL-1, BCL-w, BCL-B and A1

## Proapoptotic BCL-2 proteins

Effectors



BAX, BAK and BOK

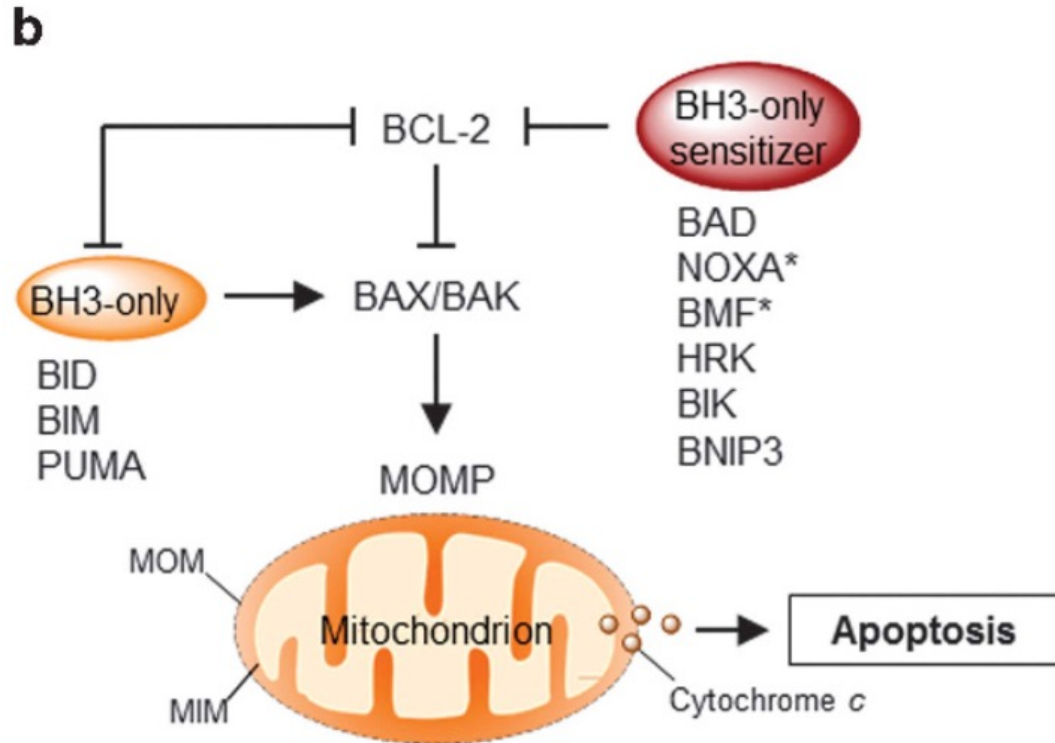
BH3-only proteins



BIM, PUMA, NOXA, BAD, BMF, HRK, BIK, BNIP3, NIX and tBID

Le proteine BCL-2 regolano la via intrinseca dell'apoptosi in cui lo step critico è rappresentato dalla permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale. Queste molecole sono distinte in molecole proapoptotiche e anti-apoptotiche. Le proapoptotiche includono: BAX, BAK e BOK e le molecole BH3-only. Le molecole anti-apoptotiche includono BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-w.

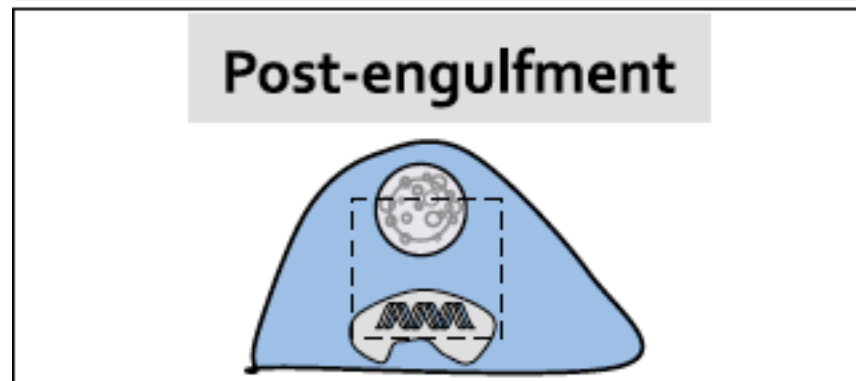
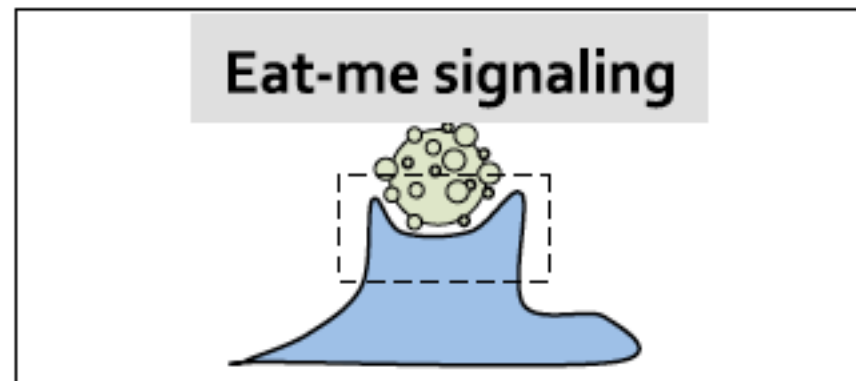
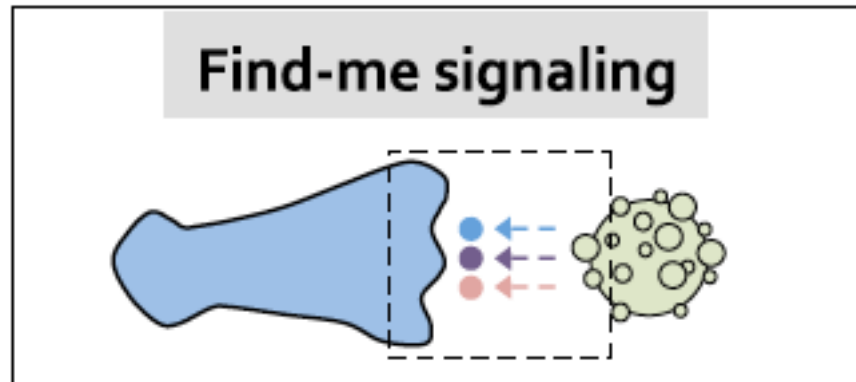
## Apoptosi intrinseca



In seguito all'attivazione da parte di stimoli apoptotici BAX, BAK e BOK inducono la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna attraverso la formazione di pori promuovendo il rilascio di citocromo c.

Le molecole pro-apoptotiche BH3-only possono attivare BAX e BAK attraverso una interazione diretta (BID, BIM, PUMA) o agire indirettamente attraverso l'interazione con le molecole anti-apoptotiche e bloccando la loro azione inibitoria su BAX, BAK.

## Riconoscimento dei neutrofili in apoptosi

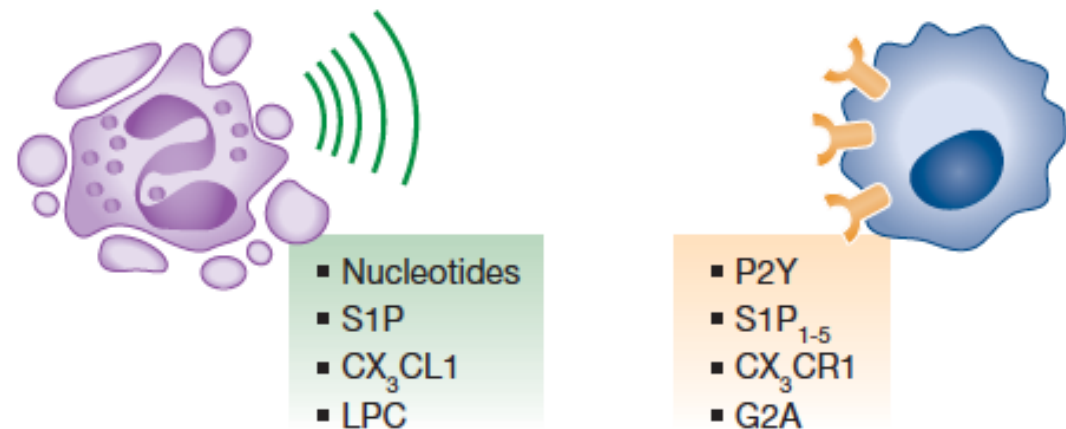


Durante l'apoptosi i neutrofili rilasciano segnali solubili nell'ambiente extracellulare che attirano i macrofagi e ne stimolano le capacità fagocitiche.

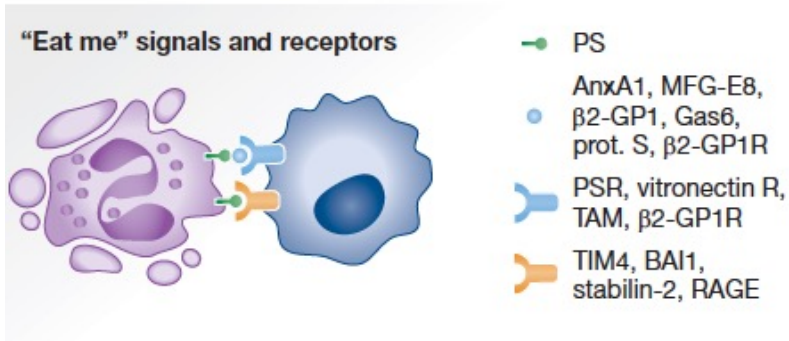
Questi segnali definiti «find me signals» includono:

- Lipidi di membrana modificati quali la lisofosfatidil colina (LPC) e sfingosina-1-fosfato (S1P), ATP e chemochine
- Durante l'apoptosi la caspasi 3 scinde attivandola la PLA<sub>2</sub> che genera lisofosfatidil colina dalla fosfatidil colina. LPC è secreta dalla cellula mediante trasportatori. Queste molecole agiscono da fattori chemiotattici.

### “Find me” signals and receptors



## Segnali di riconoscimento dei neutrofilii in apoptosi

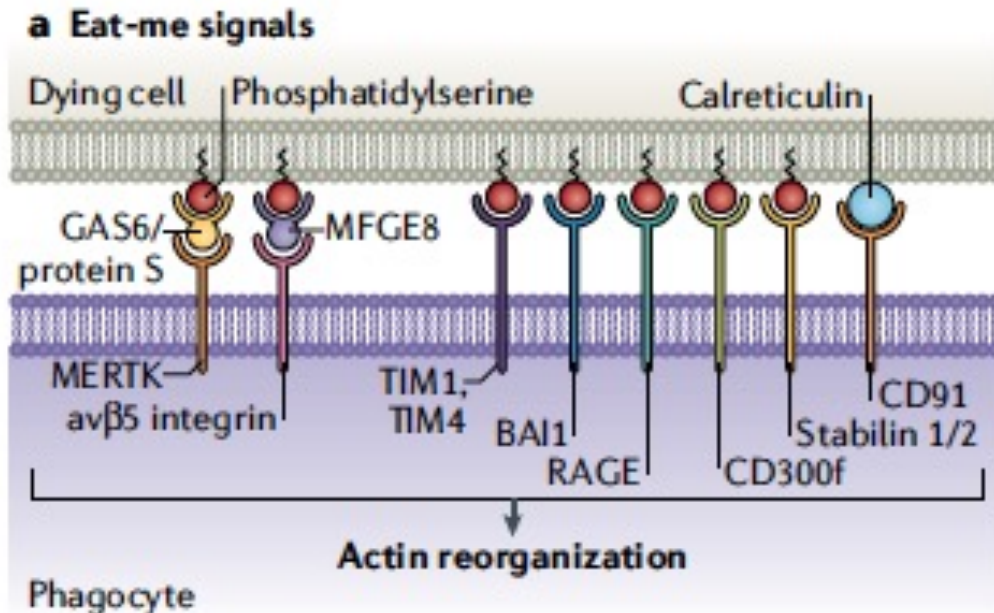


Le cellule morenti presentano sulla loro superficie segnali «eat me» che permettono ai macrofagi di discriminare le cellule in apoptosi da quelle sane.

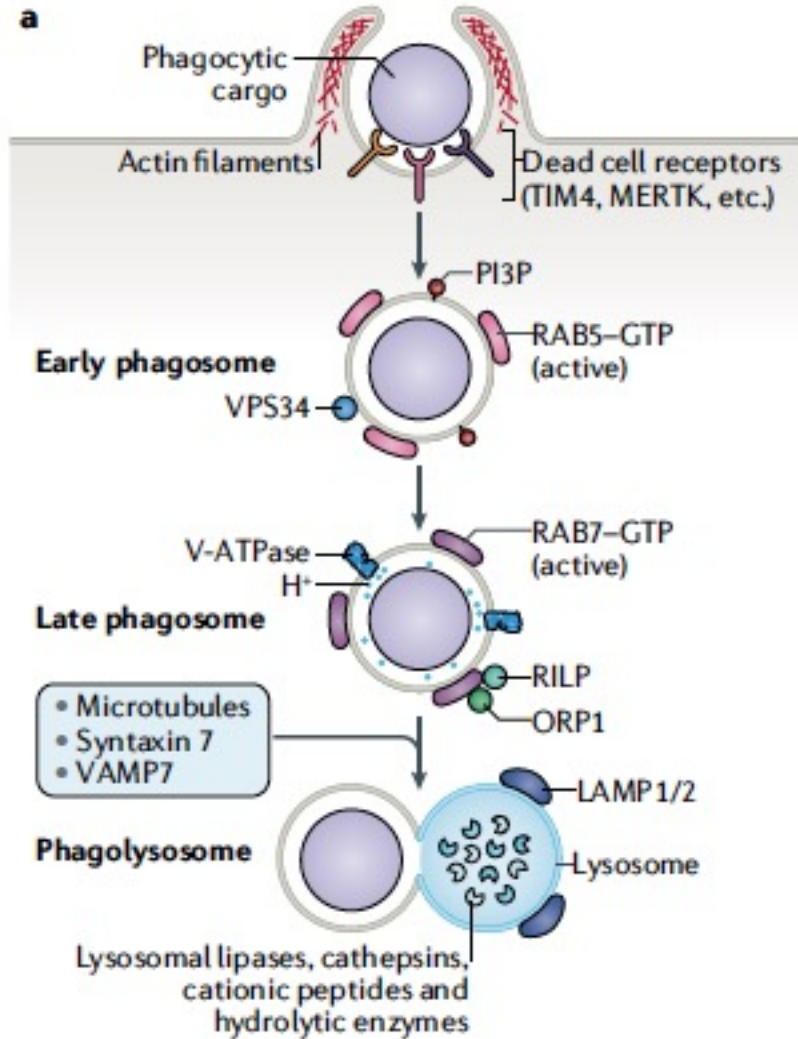
Le cellule morenti perdono l'asimmetria dei fosfolipidi di membrana (fosfatidil etanolamina e fosfatidil serina nello strato interno della membrana plasmatica) che è mediata dalla flippase ATP11 che confina la fosfatidilserina (PS) nello strato interno della membrana plasmatica e ne limita la mobilità laterale nelle cellule sane.

Durante l'apoptosi l'inattivazione di ATP11 da parte della caspasi 3 promuove l'esposizione della fosfatidil serina sulla superficie delle cellule apoptotiche rendendole riconoscibili da parte dei macrofagi.

I recettori della fosfatidilserina includono T cell immunoglobulin mucin receptor (TIM4) o fattori solubili che fanno da ponte fra le integrine e recettori TAM e la PS (bridged by milk fat globule-EGF factor 8, MFGE8)

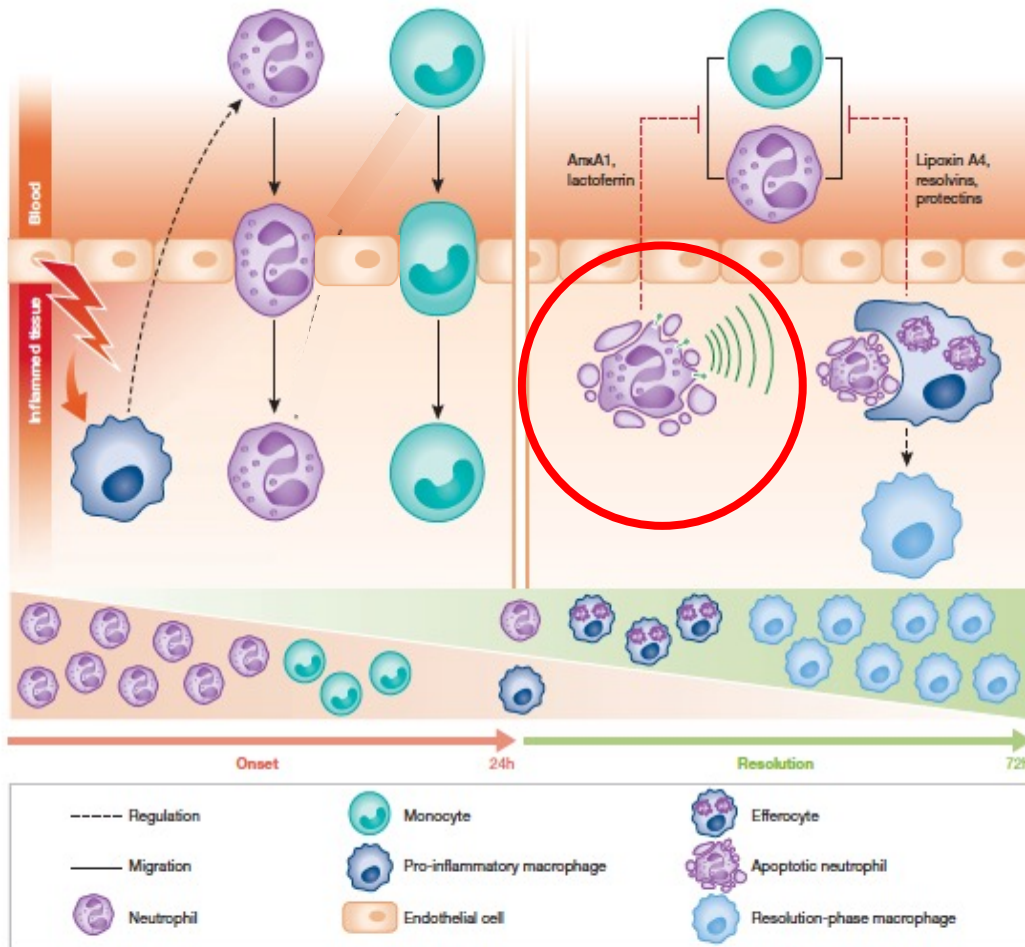


# Degradazione



L'eliminazione dei corpi apoptotici da parte del fagocita avviene nel lisosoma e prevede la maturazione del fagosoma

# L'apoptosi dei neutrofili è centrale nella risoluzione dell'infiammazione



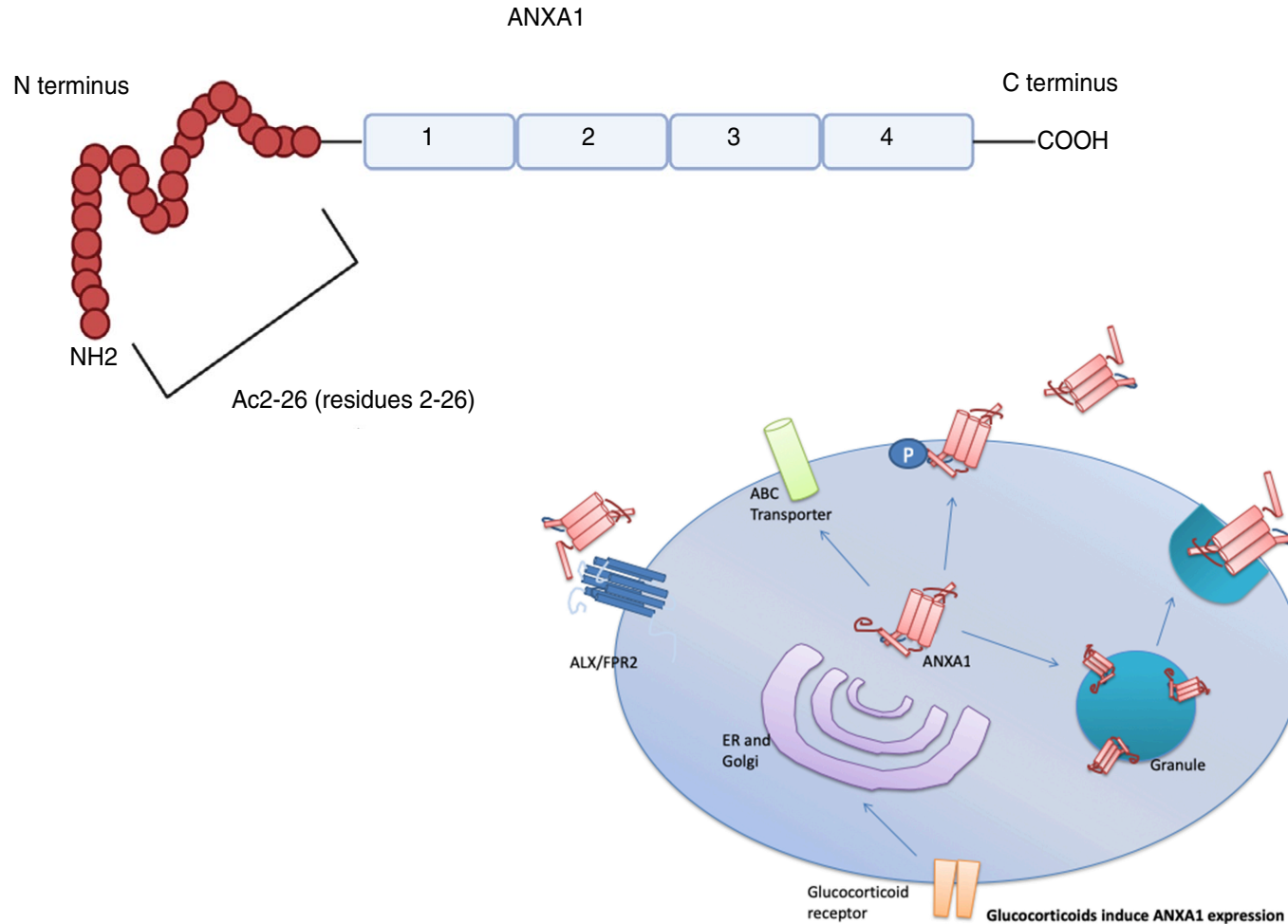
**Figure 1. Cellular interplay during resolution of inflammation.** Overview of cellular processes during onset (left) and resolution (right) of inflammation. During early phases of inflammation tissue-resident cells sense damage and launch the release of signals that induce rapid neutrophil and delayed monocyte emigration. Resolution is initiated when neutrophils become apoptotic thus secreting mediators that inhibit continued neutrophil infiltration. Ingestion of a apoptotic neutrophil changes the macrophage phenotype towards a resolution-phase macrophage, which promotes return to tissue homeostasis. A switch in tissue (stromal) cells can also contribute to generate the initial signals for resolution to start.

I neutrofili morenti attenuano l'infiammazione attraverso diversi meccanismi che includono:

- Secrezione di mediatori che inibiscono il reclutamento dei leucociti es: Annexin A1 (AnXA1).
- AnXA1 è un proteina citosolica di 37Kd che nei neutrofili trasloca sulla membrana plasmatica e viene poi secreta. ANXA1 sulle cellule lega i recettori per i peptidi formilati (FPR). Sui neutrofili agisce bloccando la transmigrazione nei tessuti.
- Produzione di mediatori lipidici ad attività anti-infiammatoria come le lipossine.

Peptidi formilati= peptidi che presentano N-formil metionina

# Struttura dell'annessina-A1

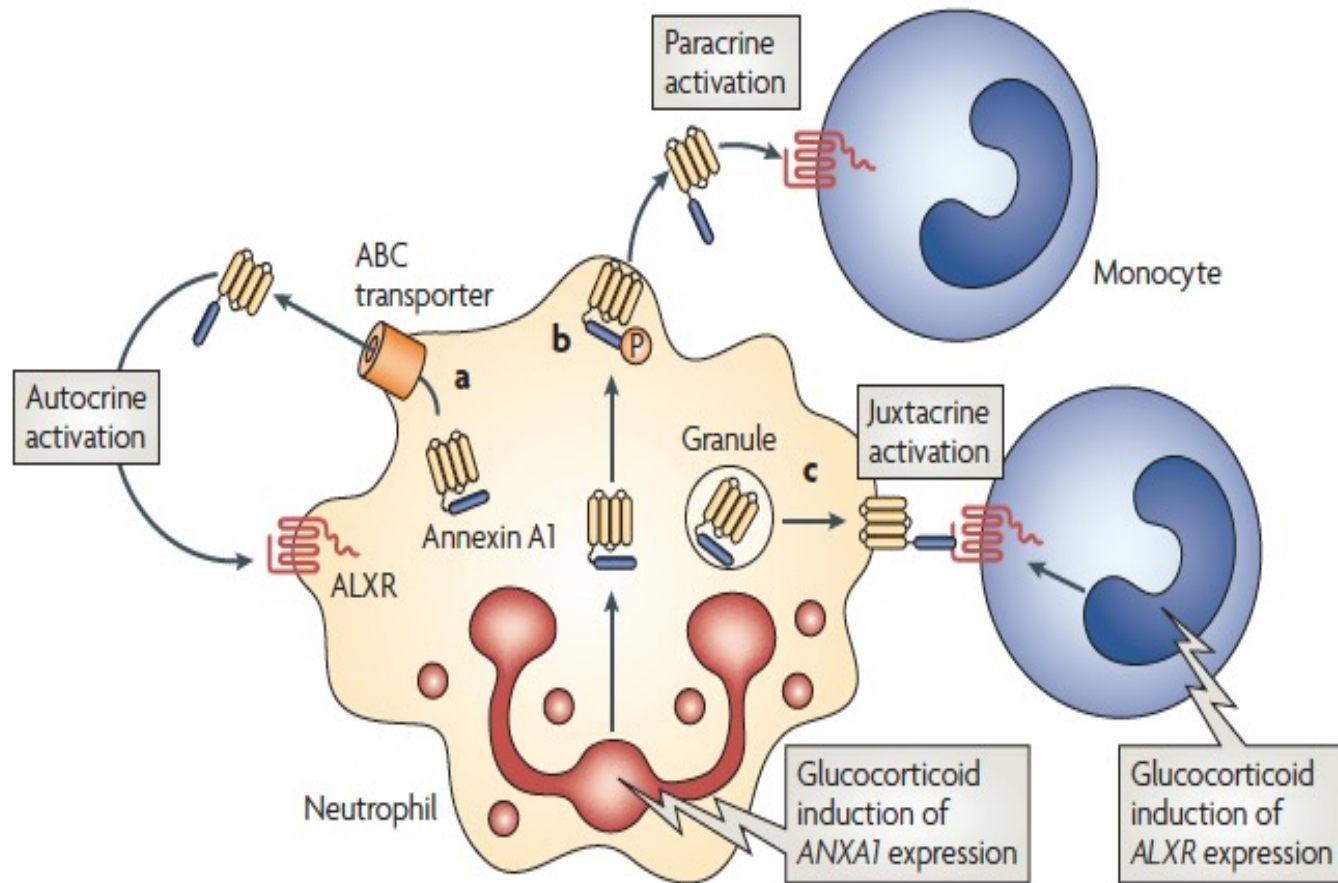


ANXA1 è composta da 4 domini che legano il Ca<sup>2+</sup> e un dominio N-terminale. In presenza di calcio ANXA1 cambia la conformazione. L'esposizione della regione N-terminale permette l'interazione con il recettore FPR.

La proteina intracellulare a seconda della cellula può essere secreta in seguito a trasporto da parte di trasportatori, fusione dei granuli con la membrana plasmatica o in seguito a fosforilazione.

La proteina ANXA1 agisce sia sulla cellula che la produce che sulle cellule adiacenti.

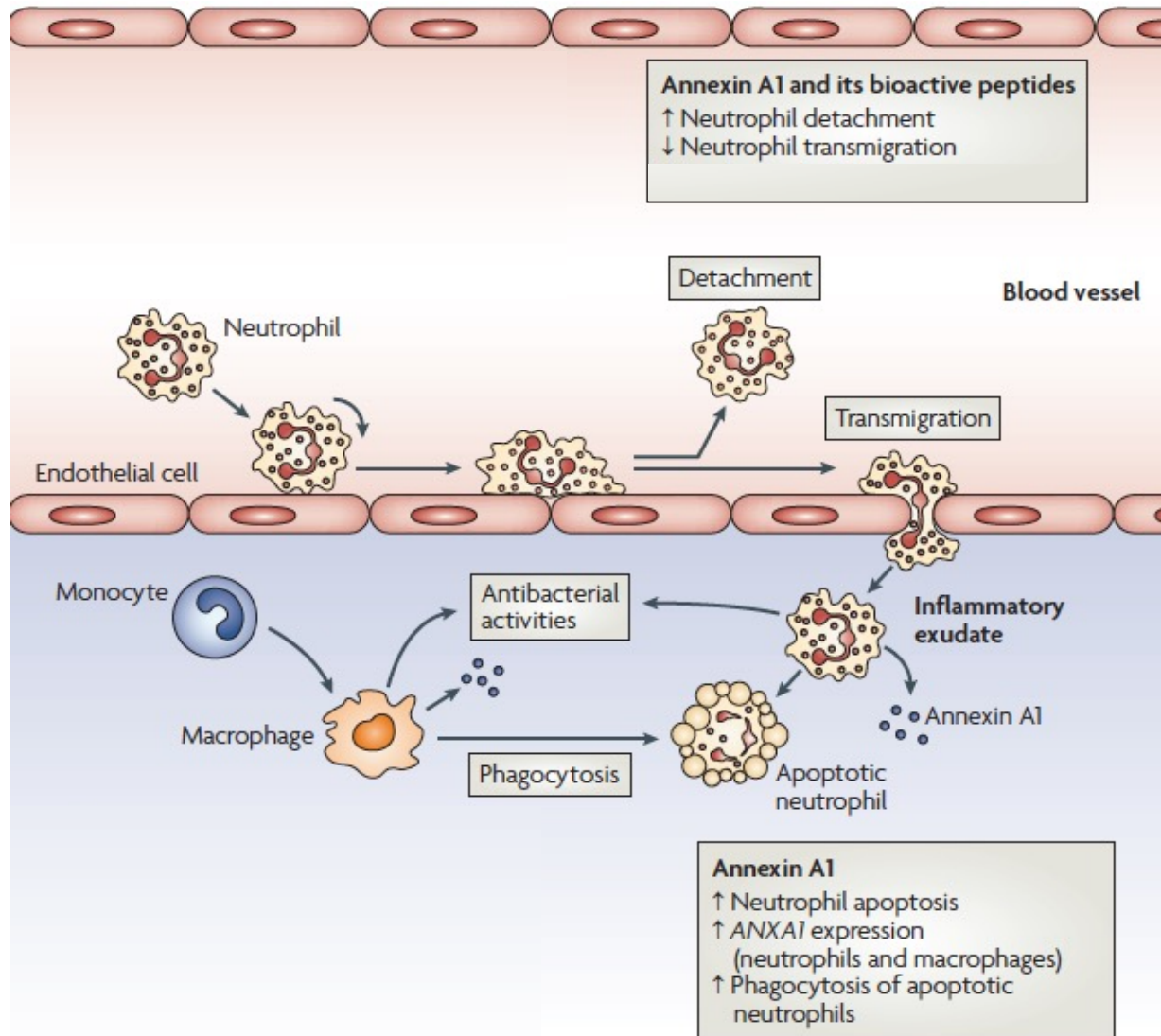
**FIGURE 1** | Upon cellular activation, ANXA1 is mobilized to the plasma membrane and then secreted in one of three mechanisms depending in the cell type involved. These mechanisms are: (1) through the ATP-binding (ABC) transporter; (2) via direct phosphorylation of ANXA1 on serine-27 followed by membrane localization to the plasma membrane, and (3) fusion of ANXA1 loaded granules to the plasma membrane. Once released ANXA1 can act in an autocrine, paracrine, and juxtacrine manner to activate ALX/FPR2 signaling.



Nei neutrofili l'annexin A1 è presente nei granuli terziari. In seguito ad attivazione dei leucociti come nel caso del contatto con le cellule degli endoteli annexin A1 viene rilasciata dai granuli:

- limitando il reclutamento dei leucociti dal circolo
- limitando la produzione di mediatori pro-infiammatori
- inducendo l'apoptosi dei neutrofili
- modulando il reclutamento dei monociti
- Aumentando l'eliminazione dei neutrofili da parte dei macrofagi

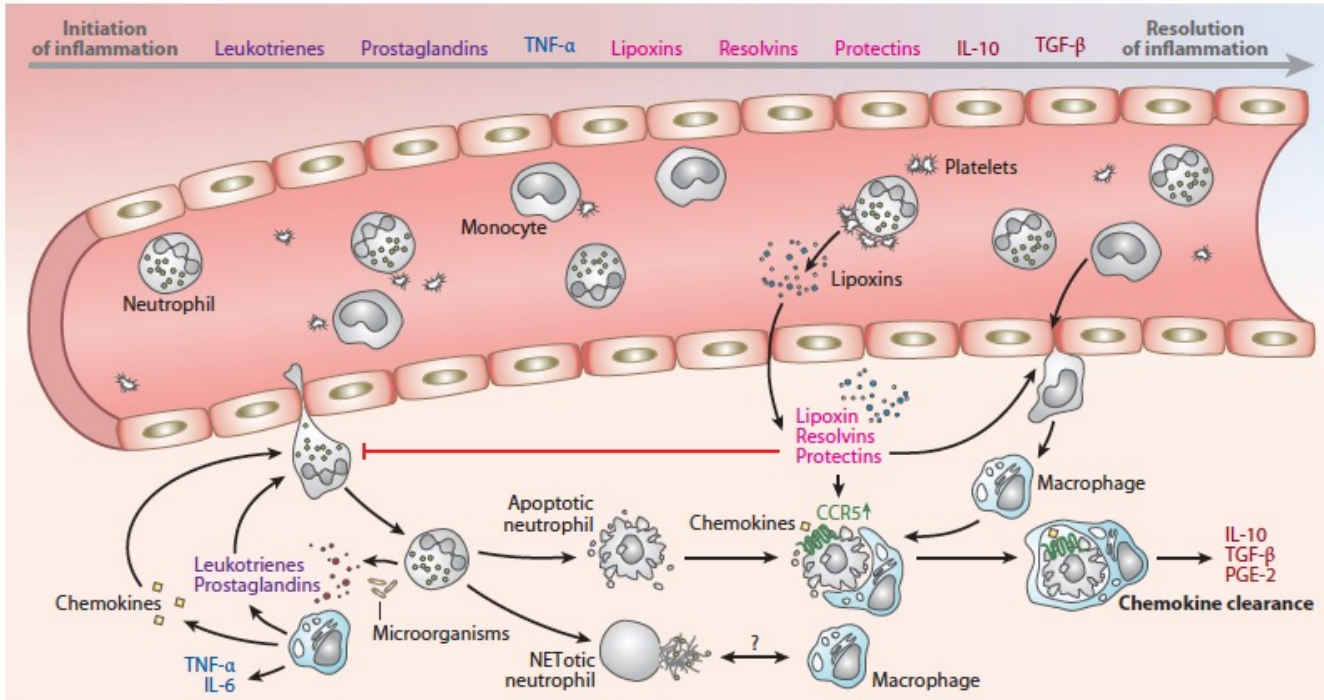
# Meccanismi di azione dell'Annexin A1



Il legame dell'annexina A1 favorisce il distacco dei neutrofili all'endotelio.

Aumenta la fagocitosi dei neutrofili da parte dei macrofagi

# I neutrofili e la risoluzione dell'infezione



Durante le fasi precoci del processo infiammatorio i neutrofili producono leucotrieni e prostaglandine successivamente queste cellule smettono di produrre leucotrieni e producono lipossine e resolvine.

Dopo aver eseguito la loro funzione microbica i neutrofili vanno incontro a morte per apoptosi. La rimozione dei corpi apoptotici viene mediata dai macrofagi.

## Mediatori lipidici promuoventi la risoluzione dell'inflammazione

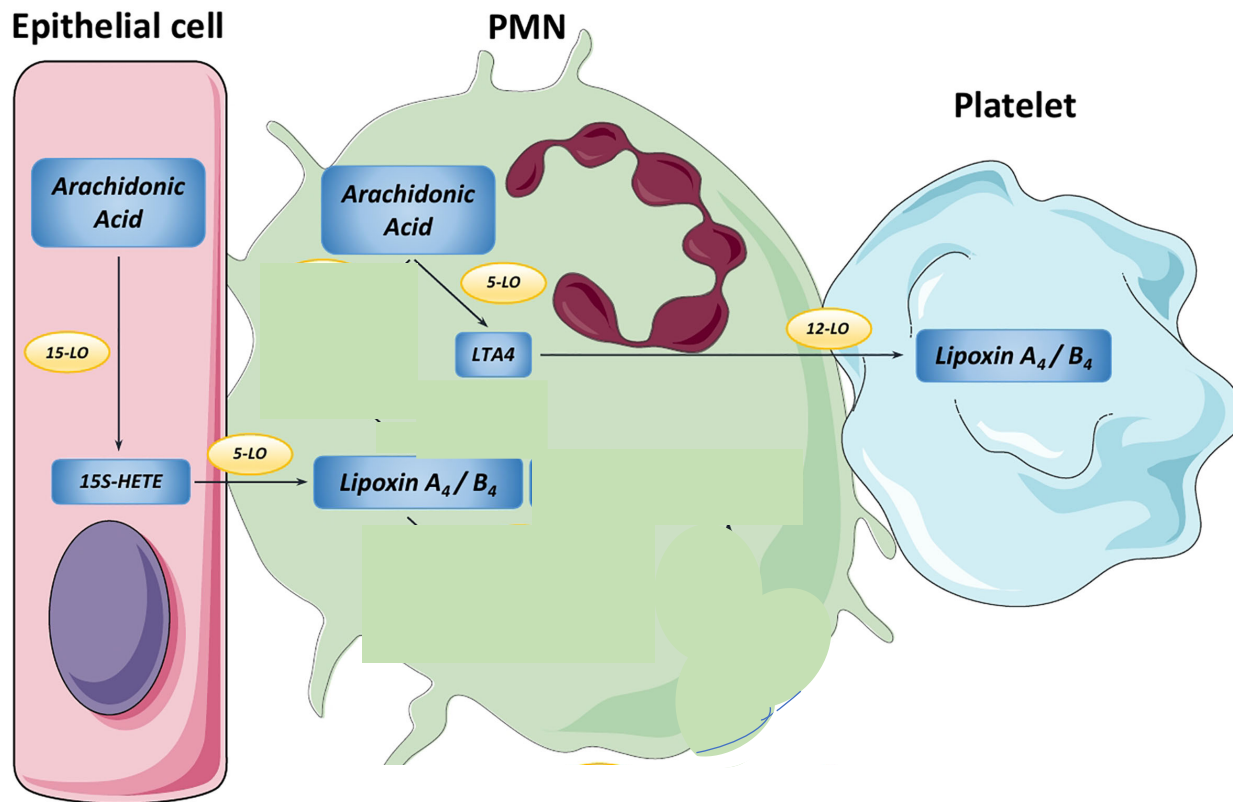
La risoluzione dell'infezione si accompagna alla sintesi di mediatori lipidici ad attività anti-infiammatoria da parte dei neutrofili.

Le lipossine sono derivati dell'acido arachidonico e possono essere prodotte dai neutrofili nel sito infiammato principalmente attraverso 2 vie.

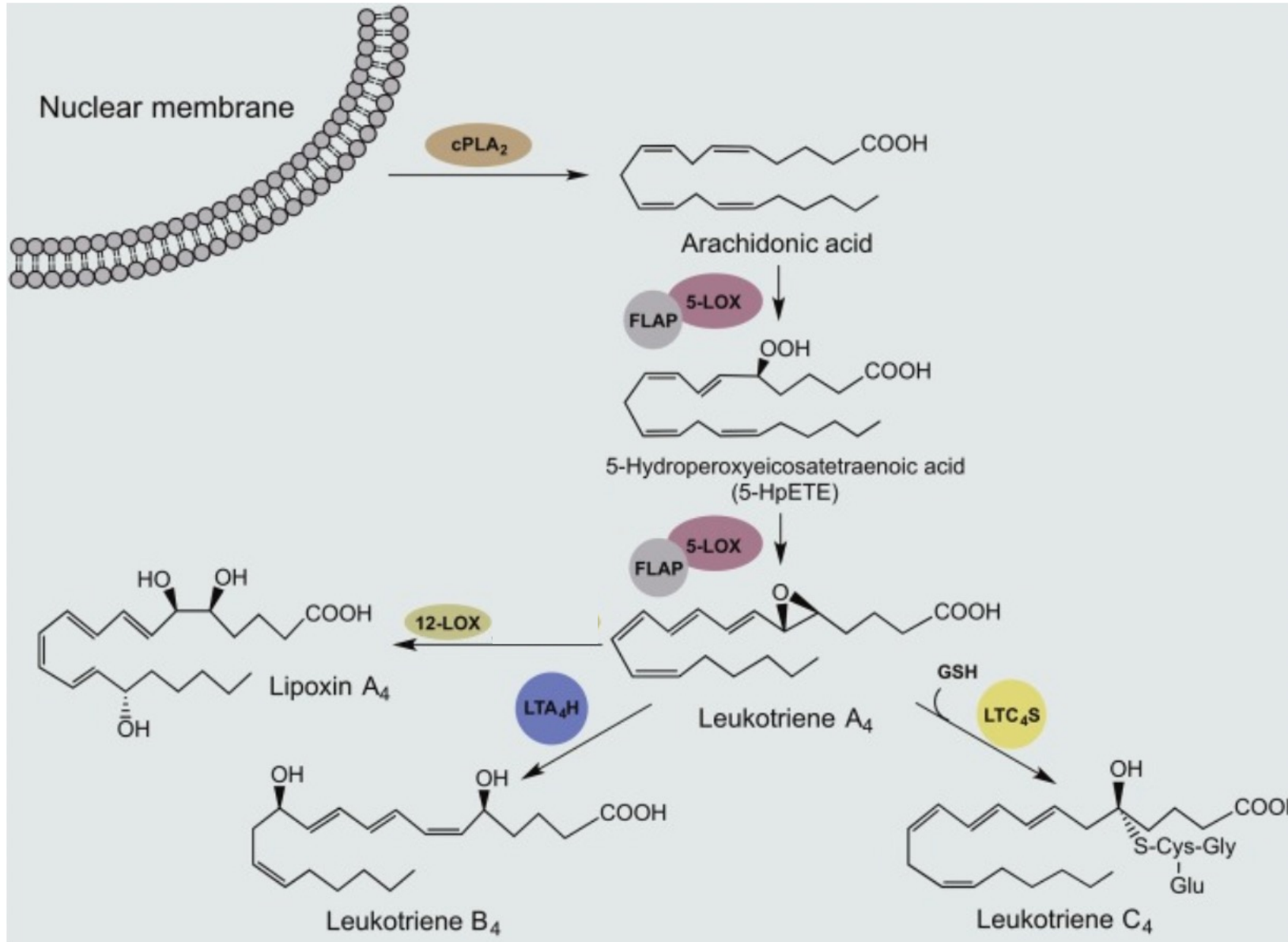
- L'acido arachidonico è convertito in LTA<sub>4</sub> (leucotriene A<sub>4</sub>) da parte della 5-lipossigenasi espressa dai neutrofili e successivamente sono prodotte le lipossine per azione della 12-LO espressa dalle piastrine.
- L'acido arachidonico è convertito in 15(S)-HETE (acido idroperossieicosatetraenoico) da parte della 15-lipossigenasi espressa dalle cellule epiteliali e successivamente sono prodotte le lipossine A<sub>4</sub>/B<sub>4</sub> ad opera della 5-LO espressa dai neutrofili.

Le lipossine:

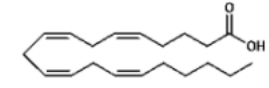
- Bloccano la migrazione dei neutrofili nei tessuti
- Bloccano la produzione di TNF- $\alpha$  da parte dei leucociti
- Promuovono la efferocitosi dei macrofagi



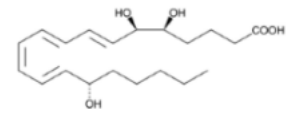
Le lipossine possono anche essere prodotte per via transcellulare cioè con il contributo di due cellule diverse come cellule epiteliali (15-LO/leucociti (5-LO) o leucociti (5-LO)/piastrine (12-LO).



ARACHIDONIC ACID (AA)



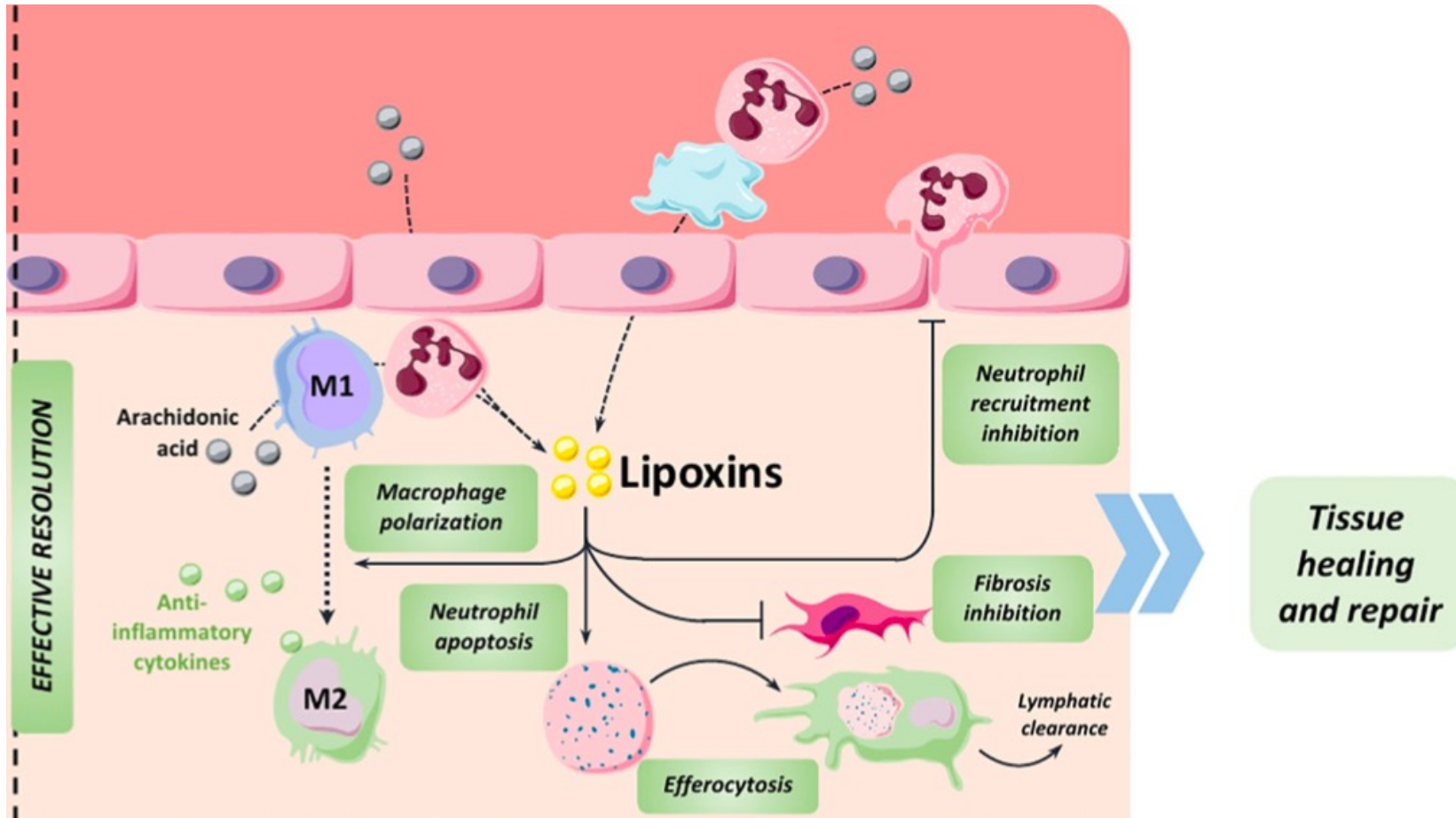
Lipoxin A<sub>4</sub>



Recettore della lipossina

LTA<sub>4</sub>H=leucotriene A<sub>4</sub> idrolasi

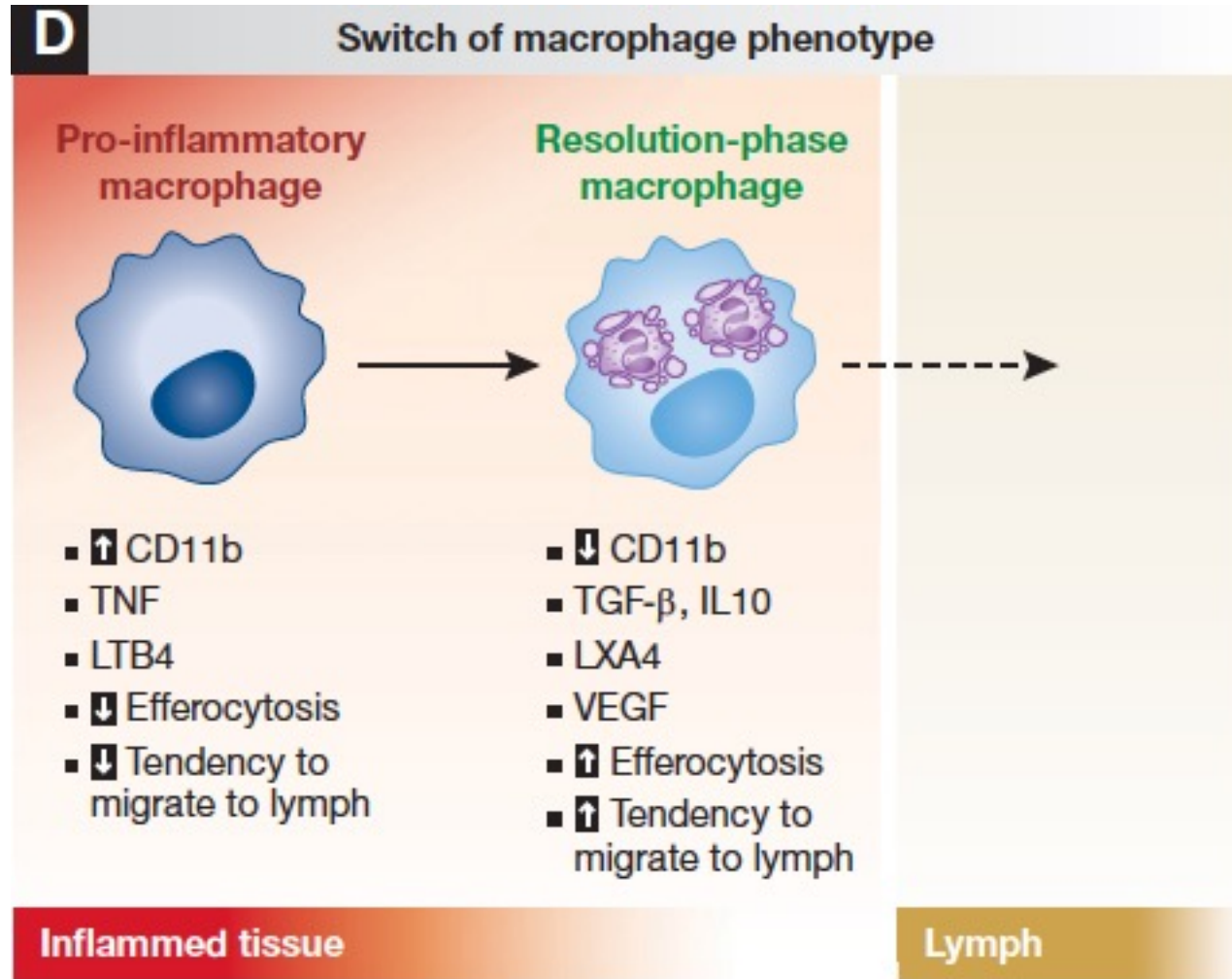
# Azione delle lipossine



Le lipossine:

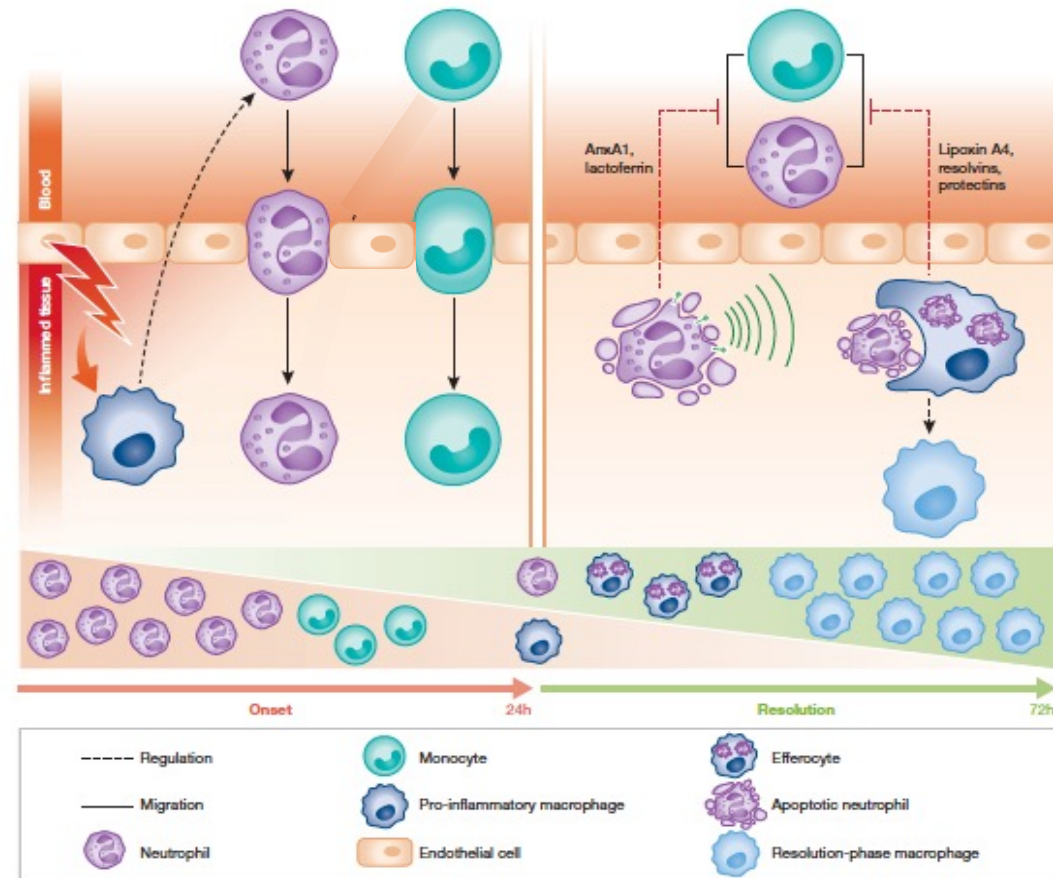
- Bloccano la migrazione dei neutrofili nei tessuti
- Bloccano la produzione di  $\text{TNF-}\alpha$  da parte dei leucociti
- Promuovono la efferocitosi dei macrofagi
- Promuovono la polarizzazione dei macrofagi in M2

# Cambiamento funzionale dei macrofagi durante la risoluzione dell'inflammatione



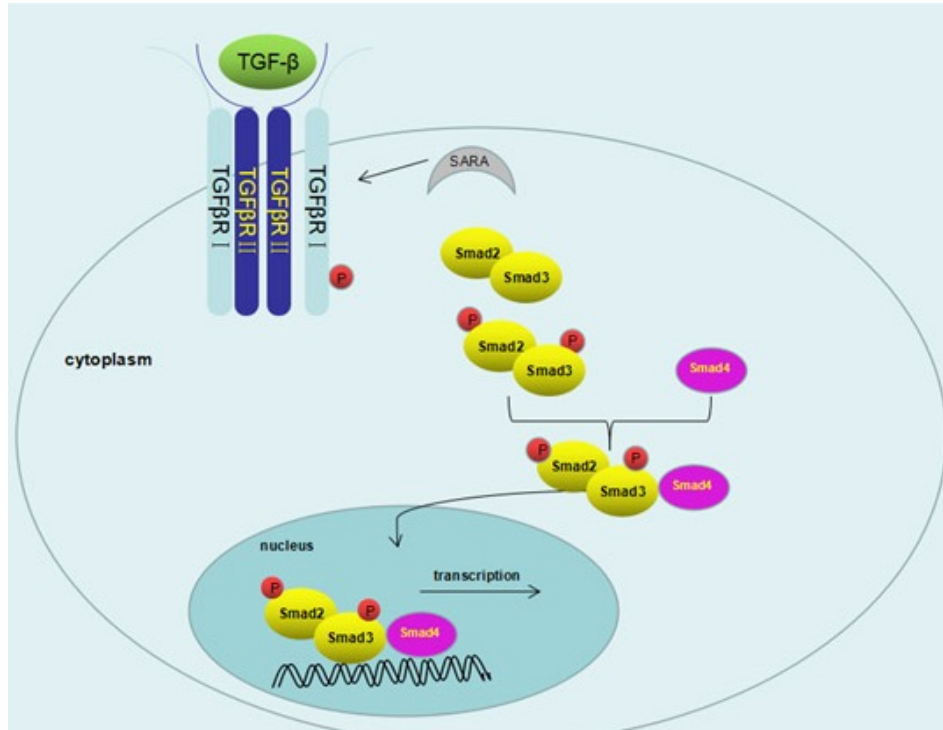
Durante l'efferocitosi dei neutrofili apoptotici i macrofagi rilasciano molecole ad attività anti-inflammatoria che includono le citochine TGF- $\beta$  e IL-10 e mediatori lipidici quali la lipoxina A4 (LXA4). I macrofagi della fase di risoluzione mostrano una più elevata capacità di fagocitare i neutrofili apoptotici, una ridotta risposta alla stimolazione del TLR4 (ligando dell'LPS).

# Cambiamento funzionale dei macrofagi durante la risoluzione dell'infiammazione



**Figure 1. Cellular interplay during resolution of inflammation.** Overview of cellular processes during onset (left) and resolution (right) of inflammation. During early phases of inflammation tissue-resident cells sense damage and launch the release of signals that induce rapid neutrophil and delayed monocyte emigration. Resolution is initiated when neutrophils become apoptotic thus secreting mediators that inhibit continued neutrophil infiltration. Ingestion of a apoptotic neutrophils changes the macrophage phenotype towards a resolution-phase macrophage, which promotes return to tissue homeostasis. A switch in tissue (stromal) cells can also contribute to generate the initial signals for resolution to start.

# Azione del TGF- $\beta$ e IL-10



L'IL-10 inibisce l'attività dei macrofagi

I TGF- $\beta$  (Fattore di crescita trasformante) sono una famiglia di citochine strettamente correlate denominate TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3. Il TGF- $\beta$ 1 è sintetizzato come precursore inattivo che deve essere scisso per formare un omodimero. Il recettore del TGF- $\beta$ 1 (serin treonin chinasi) è costituito da due catene coinvolte nella fosforilazione dei fattori di trascrizione della famiglia SMAD.

## Il TGF- $\beta$ 1

- inibisce l'attivazione in senso classico dei macrofagi
- Inibisce l'attivazione dei neutrofilii e delle cellule endoteliali
- Promuove la riparazione dei tessuti stimolando la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti e stimolando nei fibroblasti e nei macrofagi la sintesi di collagene